

Cristina Ofelia Matovelle Ochoa

Estudio epidemiológico y
molecular de *Blastocystis sp.*
en el Área Sanitaria 3 de
Zaragoza-España

Director/es

Quílez Cinca, Joaquín
Monteagudo Ibáñez, Luis Vicente

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DE
BLASTOCYSTIS SP. EN EL ÁREA SANITARIA 3
DE ZARAGOZA-ESPAÑA

Autor

Cristina Ofelia Matovelle Ochoa

Director/es

Quílez Cinca, Joaquín
Monteagudo Ibáñez, Luis Vicente

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina

2023



Universidad
Zaragoza

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR
DE *BLASTOCYSTIS* SP. EN EL ÁREA SANITARIA 3 DE
ZARAGOZA-ESPAÑA**

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

- 2023 -



Universidad
Zaragoza

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR
DE *BLASTOCYSTIS* SP. EN EL ÁREA SANITARIA 3 DE
ZARAGOZA-ESPAÑA

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por Dña. **Cristina Matovelle Ochoa** para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Trabajo realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad de
Zaragoza

Dirigida por el **Dr. Luis V. Monteagudo Ibañez** y el **Dr. Joaquín Quílez**
Cinca

Zaragoza, 2023



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza

Joaquín Quílez Cinca y Luis Vicente Monteagudo Ibáñez, Catedráticos de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “*Estudio epidemiológico y molecular de Blastocystis sp. en el Área Sanitaria 3 de Zaragoza -España*” que se recoge en la presente memoria y de la que es autora la Licenciada en Medicina y Cirugía Dña Cristina Matovelle Ochoa ha sido realizada bajo su dirección en esta Universidad, se corresponde fielmente con el proyecto de Tesis cumplimentado, registrado y aprobado en su día, y cumple los requisitos legales para que la interesada pueda optar al grado de Doctor.

Lo que suscriben como directores del trabajo en Zaragoza, a 24 de febrero de 2023

Fdo.: Dr. Joaquín Quílez Cinca

Fdo.: Dr. Luis V. Monteagudo Ibáñez

Agradecimientos

Cuando miro hacia atrás y reflexiono sobre este viaje me doy cuenta de que nada de esto habría sido posible sin la ayuda de aquellos que me tendieron la mano. Mi corazón se llena de gratitud por cada uno de ustedes.

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios Todopoderoso, a ese Ser Supremo que guía mis pasos día a día, que me cubre con su amor infinito y que ha permitido que culmine este sueño. Gracias por tu misericordia, tu bendición y tu amor infinito. Tu presencia en mi vida es un mi mayor milagro.

A mis queridos directores de tesis, Luis Monteagudo Ibáñez y Joaquín Quilez Cinca, no tengo palabras suficientes para agradecerles por su invaluable apoyo científico, moral y emocional. Gracias por toda su paciencia, sabiduría y amistad. Habéis sido unos ángeles que llegaron a mi vida en un momento crucial, y por ello, estaré eternamente agradecida. Gracias por ser los mejores directores de tesis que Dios pudo regalarme. Lo logramos.

A Teresa Tejedor, quien ha sido una mentora maravillosa y amiga durante todo este proceso. Gracias por enseñarme mucho más que estadística y ciencia, gracias por tus palabras de aliento y ánimo que hicieron mis días más divertidos y tranquilos. Tu apoyo ha sido fundamental para alcanzar esta meta y estoy agradecida por ello.

A mi tutor de tesis doctoral, José Ramón Paño Pardo, quien me enseñó con entusiasmo desde mis años de residencia el fascinante mundo de las enfermedades infecciosas. Gracias por tu apoyo.

A los facultativos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Lozano Blesa, quienes me enseñaron tanto durante mi etapa de residente. Rafael Benito, Javier Castillo, Soledad Salvo, Sonia Algarate, Cristina Seral, Elena Sánchez, María José Lavilla, Evangelina Pablo, Asunción Vitoria, Juan Sahagún, gracias por ser mis maestros y por compartir conmigo vuestra experiencia y conocimiento. En especial a Antonio Beltrán, quien colaboró para que esta tesis doctoral se llevara a cabo.

A mis compañeros de residencia, a los técnicos de laboratorio y a mis chicas de la tarde Amanda, Pilar y Begoña, gracias por haber hecho que los días pasen entre aprendizajes y risas.

María Jo Pina, gracias por ser mi amiga y confidente durante mis años en el Clínico. Su presencia fue fundamental para este logro.

A María Ángel Julián, quien siempre estuvo lista para ayudarme de la manera más dulce y agradable en esta larga aventura a cualquier hora del día, en cualquier día de la semana. Tu amistad y apoyo han sido una bendición en mi vida.

A Carlos Tellería y al equipo de Biocomputing and Health Data Science del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), quienes fueron una pieza fundamental para que esta tesis doctoral culminara de manera satisfactoria. Su experiencia y dedicación han sido un ejemplo a seguir en el mundo de la ciencia.

A José Luis Dolz, un ser enviado por Dios para ayudarme a cumplir esta meta profesional. Gracias por tus palabras de aliento y apoyo, siempre estaré agradecida por tu ayuda.

A Pilar Mozas, una persona excepcional, quien no solo nos ayudó con las secuencias genéticas, sino que también fue una mano amiga en este camino.

A Rosa Bolea y Carmen Barras, quienes fueron el puente para que este proyecto llegue a su final. Gracias por su orientación y ayuda.

A Patricia Chueca, quien me ayudó de una y mil maneras con el mundo de la biología molecular, PCRs, geles. Gracias por tu compromiso, dedicación y por estar siempre presente.

A mis amados abuelitos, quienes estuvieron conmigo desde el día en que nací y hoy celebran este logro desde el regazo del Ser Supremo. Gracias por ser mi luz y mi ejemplo de vida, por inspirarme a ser mejor cada día y por enseñarme que el amor y que la familia son la clave de todo.

A mis amados padres, quienes con su amor, sabiduría y dulzura han sido mi guía. Desde niña me enseñaron el valor del amor a Dios y al prójimo, la disciplina, la constancia y la humildad. A través de su ejemplo, me han mostrado cómo vivir una vida plena y con propósito. Le agradezco a Dios por regalarme unos padres tan maravillosos como ustedes. Gracias por ser mi apoyo constante y darme alas para perseguir mis sueños. Los amo con todo mi corazón.

A mi mejor amiga, compañera de aventuras y hermana, Prisy, quien fue mi apoyo incondicional durante este largo recorrido. Gracias por siempre estar allí, por darme tu cariño y por ser mi confidente y mi cómplice en todo momento. Juntas hasta el infinito y más allá.

A mi hermanito Jaime Patricio, quien llegó para dar luz y felicidad a nuestras vidas, te amamos mucho.

A mis queridas hermanas, Lucy y María Rosa, a mis queridos cuñados Daniel y Mauricio, y a mis amados sobrinos Supi y Sophi. Aunque la distancia nos separa, su amor y apoyo siempre estuvieron presentes en mi corazón. Gracias por animarme a seguir adelante con este sueño.

A mi hermanito Patrick, quien con cariño me daba fortaleza para terminar con este largo camino llamado tesis. Gracias por tu amor y apoyo.

A Joaquina Gil, una amiga incondicional que la vida me regaló. Gracias por todos tus consejos, tus palabras sabias, tu apoyo constante y por estar siempre junto a mí. Tu amistad es un tesoro y te agradezco por ser parte de mi vida.

Por último, deseo agradecer a todas las personas que de alguna forma se cruzaron en mi destino durante todo este tiempo y que aportaron un granito de arena para dar por finalizada esta etapa de mi vida y de mi carrera profesional.

Termino con un agradecimiento especial a mi Amado Gurú Ji. Kirpal, quien siempre se preocupa por mí y me da la fortaleza para seguir adelante: Teri Soche Kare Kirpal Socha Kíó Karedaa.

Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con fondos del Gobierno de Aragón, con una subvención prevista para la Universidad de Zaragoza (Referencia grupo Investigación T51_17R DGA Agua y salud Ambiental) y Vicerrectorado de investigación de la Universidad de Zaragoza (Proyecto puente UZ2018-BIO-01: Protozoosis intestinales y su influencia en el desarrollo de intolerancias alimentarias - Proyecto puente 2018).

La doctoranda obtuvo una subvenciones destinadas a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2020-2024 (BOA 137 de 13 de julio de 2020 - ORDEN CUS/581/2020) en la Universidad de Zaragoza financiado por el Gobierno de Aragón

Una parte de este trabajo de investigación ha sido publicado en el siguiente artículo en una revista Q1:

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.

INDICE

ÍNDICE

Resumen	21
1. Introducción	25
1.1. Descripción histórica	26
1.2. Taxonomía y filogenia	27
1.3. Ciclo biológico	30
1.4. Morfología	33
1.4.1. Forma vacuolar	34
1.4.2. Forma granular	35
1.4.3. Forma ameboide	36
1.4.4. Forma quística	38
1.4.5. Otras formas	39
1.5. Mecanismos de transmisión	40
1.6. Epidemiología y prevalencia	41
1.7. Patogenicidad	46
1.8. Virulencia	49
1.9. Manifestaciones clínicas	51
1.10. Diagnóstico	52
1.10.1. Cultivo in vitro	53
1.10.2. Microscopía	54
1.10.3. Serología	56
1.10.4. Diagnóstico molecular	56
1.10.5. Otras técnicas moleculares	59
1.10.5.1. Tipificación de secuencias Multilocus	59
1.10.5.2. Metagenómica	60
1.10.5.3. Metabarcoding	61
1.10.5.4. Secuenciación mediante nanoporos	61
1.11. Actualización de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp.	62
1.12. Tratamiento	65

1.13. Estado actual de la investigación sobre <i>Blastocystis</i> sp. en humanos en España	67
2. Justificación	71
3. Hipótesis	75
4. Objetivos	77
5. Material y Métodos	79
5.1. Materiales y muestras	80
5.1.1. Declaración de aprobación de ética	80
5.1.2. Zona de estudio	80
5.1.3. Origen de las muestras fecales	81
5.1.4. Material de laboratorio	81
5.1.4.1. Microscopía	81
5.1.4.2. Equipamiento para biología molecular	82
5.2. Métodos	82
5.2.1. Descripción de variables analizadas	82
5.2.1.1. Variables analizadas en casos y controles	82
5.2.1.2. Variables analizadas exclusivamente en los casos	83
5.2.2. Análisis microscópico de muestras fecales	83
5.2.2.1. Preparación de las muestras fecales	83
5.2.2.2. Observación microscópica en fresco	84
5.2.2.3. Observación microscópica con tinción de Ziehl-Neelsen modificada	85
5.2.3. Estudio microbiológico de las muestras fecales	85
5.2.4. Análisis molecular de las muestras positivas a <i>Blastocystis</i> sp.	86
5.2.4.1. Extracción de ADN	86
5.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa	87
5.2.4.3. Electroforesis en gel de agarosa	89
5.2.4.4. Secuenciación	89
5.2.5. Análisis filogenético	90
5.2.5.1. Neighbor Joining (NJ)	90

5.2.5.2.	Análisis de bootstrap	91
5.2.5.3.	Diversidad genética	91
5.2.6.	Análisis epidemiológico-estadístico	92
6.	Resultados	95
6.1.	Epidemiología clínica	96
6.2.	Epidemiología molecular	104
6.2.1.	Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados	104
6.2.2.	Comparación con otras secuencias depositadas en GenBank®	107
6.2.3.	Homología entre secuencias genéticas de cada subtipos	107
6.2.4.	Identificación de subtipos y alelos y su relación con el origen de los pacientes	113
6.2.5.	Análisis filogenético	118
6.2.6.	Diversidad genética de las secuencias de <i>Blastocystis</i> sp.	122
7.	Discusión	125
7.1.	Epidemiología clínica	126
7.2.	Epidemiología molecular	133
8.	Conclusiones	145
9.	Anexos y trabajos	149
10.	Referencias	195

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Prevalencia de infecciones por <i>Blastocystis</i> en diferentes países.....	42
Tabla 2 Evolución histórica del diagnóstico de <i>Blastocystis</i> sp. mediante cultivo.....	54
Tabla 3 Técnicas de microscopía para la detección de <i>Blastocystis</i> sp.....	56
Tabla 4 Técnicas de diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i> sp.....	59
Tabla 5 Frecuencia de subtipos (%) de <i>Blastocystis</i> sp. identificados en infecciones humanas en diversos estudios en España.....	69
Tabla 6 Mezcla de reacción para amplificar por PCR (18S rRNA de eucariotas)	88
Tabla 7 Mezcla de reacción para amplificar por PCR (SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> sp.).....	88
Tabla 8 Distribución de parámetros demográficos/antropométricos y tratamiento inmunosupresor en casos (pacientes positivos a <i>Blastocystis</i>) y controles (pacientes negativos a <i>Blastocystis</i>).....	97
Tabla 9 Síntomas clínicos, comorbilidades, co-infecciones y parámetros hematológicos /bioquímicos en casos (pacientes <i>Blastocystis</i> positivos) y controles (pacientes <i>Blastocystis</i> negativos).....	99
Tabla 10 Matriz de componentes rotados: cargas de los componentes principales 1, 2 y 3 sobre variables relacionadas con la ausencia/presencia de patógenos. Los coeficientes por debajo de 0,3 (valor absoluto) se han suprimido para facilitar la interpretación.....	100
Tabla 11 Características de los individuos incluidos en los 6 agrupamientos obtenidos en el estudio. La ausencia o presencia de un patógeno en particular se registró como - y +, respectivamente.....	102
Tabla 12 Descripción del número de pacientes con blastocistosis y co-infecciones incluidos en el análisis de componentes principales.....	103
Tabla 13 Modelo final de regresión logística binaria, que muestra la asociación estadística entre infección por <i>Blastocystis</i> sp. con diversos parámetros como el origen del paciente, presencia de bacterias patógenas, dolor abdominal, anorexia, halitosis, diabetes tipo 2 y tratamiento con corticoides y eosinofilia relativa (variable cuantitativa).....	104
Tabla 14 Frecuencia y porcentaje de cada subtipo de <i>Blastocystis</i> sp.	105
Tabla 15 Pacientes con variación de subtipos en muestras repetidas	106
Tabla 16 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> de ST1. Hubo un total de 136 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (94,26%).....	109

Tabla 17 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> de ST2. Hubo un total de 465 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (94,72%).....	110
Tabla 18 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> de ST3. Hubo un total de 903 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (91,38%).....	111
Tabla 19 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> de ST4. Hubo un total de 190 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (99,72%).....	112
Tabla 20 Frecuencia de la distribución de subtipos y alelos de las secuencias genéticas de <i>Blastocystis</i> sp.....	114
Tabla 21 Distribución de alelos de <i>Blastocystis</i> sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST1.....	114
Tabla 22 Distribución de alelos de <i>Blastocystis</i> sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST2.....	115
Tabla 23 Distribución de alelos de <i>Blastocystis</i> sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST3.....	116
Tabla 24 Distribución de alelos de <i>Blastocystis</i> sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST4.....	117
Tabla 25 Variabilidad genética de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados en el área sanitaria 3 de Zaragoza	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Posición filogenética de <i>Blastocystis</i> sp.	29
Figura 2. Fisión binaria de células de <i>Blastocystis</i> sp. en cultivo de medio de Jones.....	30
Figura 3 Ciclo vital de <i>Blastocystis</i> propuesto por Boreham y Stenze (1993b).....	31
Figura 4 Ciclo vital de <i>Blastocystis</i> sp. propuesto por Tan (2004).....	38
Figura 5 Morfología de <i>Blastocystis</i> con microscópio de contraste de fases. A) Forma vacuolar y de quiste, B) Forma granular y C) Forma ameboide.....	33
Figura 6 Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> sp. mediante examen microscópico en fresco Jones.....	34
Figura 7 Forma granulares de <i>Blastocystis</i> sp. en cultivo xénico.....	36
Figura 8 Forma ameboide de <i>Blastocystis</i> sp. en cultivo xénico, se observan extensiones citoplasmáticas similares a pseudópodos.....	37
Figura 9 Forma de quiste de <i>Blastocystis</i> sp.	39
Figura 10 Algunos mecanismos de patogenicidad de <i>Blastocystis</i> sp. en cultivo intestinal <i>in vitro</i>	50
Figura 11 Subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados actualmente y hospedadores.....	64
Figura 12 Imagen de campo de microscopio (100× aumentos) obtenida en una muestra de un paciente infectado por <i>Blastocystis</i> sp. con alta carga parasitaria.....	85
Figura 13 Descripción gráfica del funcionamiento de una PCR anidada.....	87
Figura 14 Visualización en gel de agarosa: Amplificación del fragmento de SSU-rRNA de <i>Blastocystis</i> sp. de muestras positivas.....	89
Figura 15 Sección del cromatograma donde se evidencia picos dobles indicativos de infecciones mixtas. Secuenciación por el método Sanger del gen SSU-rRNA.....	106
Figura 16 Ejemplo de asignación de alelos de las secuencias genéticas a través de la base de datos de tipificación de secuencias Multilocus de <i>Blastocystis</i> ST: Número de secuencia 1008 en el que se obtiene el alelo 2.....	113

Figura 17 Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* (Santín et al., 2011) y secuencias de referencia representativas de distintos subtipos. Se utilizó *Proteromonas lacertae* como outgroup para enraizar el árbol. Se añadieron otras secuencias genéticas obtenidas de la base de datos de GenBank® que correspondían a otros subtipos de *Blastocystis* (MF186709.1: ST5, MW713074.1: ST6, OL351742.1: ST7, MK357782.1: ST9) El análisis se realizó mediante Neighbor Joining. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el modelo Kimura 2. Este análisis involucró 83 secuencias de nucleótidos.....119

Figura 18 Análisis filogenético de 83 secuencias parciales del gen SSU rRNA de *Blastocystis* y secuencias de referencia representativas de distintos subtipos. Se utilizó una secuencia de *Proteromonas lacertae* como outgroup y secuencias de otros subtipos de *Blastocystis* obtenidas de GenBank® (LC414134.1 y MK874786.1: ST1 *Homo sapiens*, EU445491.1: ST2 Mono (sic.), MT089925.1 y MK874818.1: ST2 *Homo sapiens*, MN914073.1: ST3 *Homo sapiens*, y MH127478.1: ST4 *Rattus exulans*). En total hubo 352 combinaciones en el conjunto de datos final. El análisis se realizó mediante Neighbor Joining. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el modelo Kimura 2121

Figura 19 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST1. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA.....123

Figura 20 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST2. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA.....123

Figura 21 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST3. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA.....124

Figura 22 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST4. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA.....124

RESUMEN

Blastocystis sp. está considerado uno de los parásitos más prevalentes en muestras fecales humanas en todo el mundo. En el presente trabajo se ha realizado un estudio epidemiológico y molecular para investigar su prevalencia y diversidad genética en pacientes con síntomas gastrointestinales pertenecientes al área sanitaria 3 de Zaragoza-España y diagnosticados en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de esta ciudad. Por una parte, se ha realizado un estudio de casos y controles (1:9.89, ~ 10) en el que se analizaron un total de 6.087 muestras fecales recogidas en 3.682 pacientes entre el 1 de enero y 31 de diciembre de 2018, investigando la presencia de *Blastocystis* sp. y otros patógenos intestinales mediante técnicas microscópicas y microbiológicas. En todos los pacientes se recogieron además variables demográficas, antropométricas y médicas, con el fin de determinar su posible asociación con la infección por *Blastocystis* sp. Tras el diagnóstico microscópico se ha detectado una elevada prevalencia de este microorganismo (9,2%), siendo el parásito más prevalente en la zona de estudio y el único identificado en la mayoría de pacientes infectados. Se ha observado que la probabilidad de estar infectado es significativamente mayor en individuos de bajo peso y en aquéllos que procedían de América Central y del Sur, y especialmente de África. Entre las variables asociadas positivamente a la infección por *Blastocystis* sp. también se incluyen determinados síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, anorexia, halitosis), junto con la presencia de eosinofilia relativa, co-infecciones con bacterias patógenas, padecimiento de diabetes tipo 2 o administración de determinados tratamientos inmunosupresores. Por el contrario, no se observó una relación estadística con otros síntomas como presencia de diarrea o fiebre, ni tampoco con procesos como el síndrome de colon irritable.

En una segunda fase se ha realizado un estudio molecular de las muestras positivas a *Blastocystis* sp. con el fin de identificar los subtipos del parásito circulantes en la población objeto de estudio e investigar su filogenia, diversidad genética y grado de homología con aislados de origen humano y animal depositados en GenBank®. Para ello se ha utilizado un protocolo de PCR que amplifica un fragmento del gen de SSU-rRNA de ~ 479bp. Este fragmento contiene una región variable que permite el subtipado tras secuenciación Sanger y posibilita el análisis filogenético. En total se identificaron cuatro subtipos, incluyendo las variantes ST3 (34,7%) y ST2 (34,1%), junto con dos subtipos minoritarios (ST1 y ST4) que fueron observados con idéntica frecuencia (15,6% cada uno). En algunos pacientes se identificaron infecciones mixtas en los subtipos ST1 y ST2, que fueron evidenciadas por la presencia de picos dobles en trazos de los cromatogramas, lo que indica que un mismo hospedador puede estar infectado

por múltiples subtipos. El análisis de las secuencias también ha revelado la presencia de alelos de *Blastocystis* sp. no descritos previamente, siendo destacable que algunas secuencias fueron idénticas a otras de origen humano y especialmente de diversas especies animales depositadas en GenBank®, lo que apoyaría el carácter zoonótico potencial de este parásito. Finalmente, cabe destacar los hallazgos del estudio filogenético por Neighbor Joining, que revela la alta variabilidad de los subtipos ST1 y ST2, lo que sugiere su origen polifilético o un proceso evolutivo más largo en el tiempo. La variabilidad es por el contrario mucho menor en las secuencias de subtipos ST3 y especialmente ST4, lo que apoyaría su origen monofilético y transmisión más reciente a humanos. El objetivo de este trabajo de investigación es profundizar en el conocimiento de la epidemiología clínica y molecular de la infección por *Blastocystis* sp., mediante un estudio de casos y controles en pacientes con síntomas gastrointestinales pertenecientes al área sanitaria 3 de Zaragoza, utilizando para ello técnicas microscópicas y moleculares.

ABSTRACT

Blastocystis sp. is considered one of the most prevalent parasites in human fecal samples worldwide. In this study, an epidemiological and molecular investigation was conducted to determine its prevalence and genetic diversity in patients with gastrointestinal symptoms from the 3rd health area of Zaragoza, Spain, who were diagnosed at the Microbiology and Parasitology Service of the Lozano Blesa University Clinical Hospital in this city. Firstly, a case-control study (1:9.89, ~ 10) was carried out, in which a total of 6.087 fecal samples were analyzed from 3.682 patients between January 1st and December 31st, 2018, investigating the presence of *Blastocystis* sp. and other intestinal pathogens using microscopic and microbiological techniques. In addition, demographic, anthropometric, and medical variables were collected from all patients to determine their possible association with *Blastocystis* sp. infection. After microscopic diagnosis, a high prevalence of this microorganism (9.2%) was detected, making it the most prevalent parasite in the study area and the only one identified in the majority of infected patients. It was observed that the probability of being infected is significantly higher in underweight individuals and those from Central and South America, and especially from Africa. Among the variables positively associated with *Blastocystis* sp. infection are certain gastrointestinal symptoms (abdominal pain, anorexia, halitosis), relative eosinophilia, co-infections with pathogenic bacteria, type 2 diabetes, or administration of certain

immunosuppressive treatments. On the other hand, no statistical relationship was observed with other symptoms such as diarrhea or fever, nor with processes such as irritable bowel syndrome.

In a second phase, a molecular study was conducted on samples positive for *Blastocystis* sp. to identify the parasite subtypes circulating in the study population and investigate their phylogeny, genetic diversity, and degree of homology with human and animal isolates deposited in GenBank®. For this purpose, a PCR protocol was used to amplify a ~ 479bp fragment of the SSU-rRNA gene. This fragment contains a variable region that allows subtyping after Sanger sequencing and enables phylogenetic analysis. Four subtypes were identified in total, including the ST3 (34.7%) and ST2 (34.1%) variants, along with two minor subtypes (ST1 and ST4) that were observed with identical frequency (15.6% each). In some patients, mixed infections with ST1 and ST2 subtypes were identified, which were evidenced by the presence of double peaks in chromatogram traces, indicating that a single host may be infected with multiple subtypes. Sequence analysis also revealed the presence of *Blastocystis* sp. alleles not previously described, and some sequences were identical to those from human and various animal species deposited in GenBank®, supporting the potential zoonotic nature of this parasite. Finally, it is noteworthy that the phylogenetic analysis by Neighbor Joining revealed high variability among the ST1 and ST2 subtypes, suggesting their polyphyletic origin or a longer evolutionary process over time. In contrast, the variability is much lower in the sequences of the ST3 and especially ST4 subtypes, supporting their monophyletic origin and more recent transmission to humans. The aim of this research is to deepen the knowledge of the clinical and molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. infection, through a case-control study in patients with gastrointestinal symptoms belonging to the health area 3 of Zaragoza, using microscopic and molecular techniques.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción histórica

Blastocystis sp. fue descrito por primera vez en 1911 por Alexeieff, quien lo clasificó como una levadura saprófita intestinal a la que denominó *Blastocystis enterocola*. Sin embargo, un año más tarde en 1912, Emile Brumpt tras estudiar su presencia en heces humanas en París lo describe como *Blastocystis hominis* (Salinas y Gonzales, 2007). Las primeras imágenes que se tienen de *Blastocystis* sp. corresponden a una epidemia de cólera en Londres, en el año 1849, aunque los investigadores lo asociaron a una suspensión de polvo en agua condensada del aire y lo denominaron células anulares (Zierdt, 1991a). Asimismo, la primera descripción morfológica de *Blastocystis* se intuye que fue realizada en 1899 y aunque los informes no incluían ninguna imagen, se han revelado datos que hacen pensar que se trataba de *Blastocystis* sp., pero existe muy poca información que confirme la veracidad de este hecho (Alger, 2007).

Blastocystis sp. fue considerado durante años como un hongo, una célula degenerada o un artefacto; sin embargo, este microorganismo recuperó el interés clínico y científico tras el trabajo presentado por Zierdt et al., (1967), donde describieron su naturaleza protozoaria basándose en las características de los cultivos, su morfología y fisiología; estos investigadores sugieren un probable papel patógeno primario para este microorganismo y lo clasificaron como un protozoo denominado *Blastocystis hominis*, perteneciente al reino Protista, subreino Protozoa y phylum Sarcomastigophora.

Los primeros estudios mediante herramientas moleculares, concretamente basados en el análisis de su pequeña subunidad de RNA (SSU-rRNA) también lo incluyen dentro de los protistas, pero como un Stramenopile (Silberman et al., 1996). Dos años más tarde y con la clasificación de los seis reinos de Cavalier-Smith (1998) se sitúa a *Blastocystis* sp. en el supergrupo Chromalveolata, dentro de la subdivisión Stramenopile y el subgrupo Opalinata. Las investigaciones más recientes basadas en el estudio filogenético del gen SSU-rRNA consideran que *Blastocystis* es el único parásito humano perteneciente al reino Stramenopile, como una rama de Chromalveolata (Karasartova et al., 2018).

El avance de las técnicas moleculares ha permitido identificar distintos subtipos de *Blastocystis* sp., cuyas diferencias aparentemente afectan a su poder patógeno y también a su especificidad del hospedador, tal como se ha ido comprobando en los años recientes. A partir de 2007 se ha unificado la información sobre subtipos de *Blastocystis* en muestras fecales de

aves y mamíferos, lo que permite sustituir *Blastocystis hominis* por *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2007b). A día de hoy se han descrito 38 subtipos de *Blastocystis* sp. (Maloney et al., 2023).

1.2. Taxonomía y filogenia

La taxonomía de *Blastocystis* sp. ha sido un enigma durante más de un siglo y la descripción histórica demuestra la dificultad que se tuvo para identificar su posición taxonómica. Los primeros en proporcionar un estudio ultraestructural de *Blastocystis* sp. fueron Zierdt et al., (1967) quienes demostraron que este parásito no es una levadura o un hongo, ni tampoco un quiste de otro microorganismo o material vegetal, sino un protozoo, conclusiones sustentadas por los estudios posteriores de otros autores (Boreham y Stenzel, 1993a).

La morfología de *Blastocystis* es también compatible con la de protozoos, por la ausencia de pared celular, presencia de uno o más núcleos, organelas como mitocondrias, aparato de Golgi, o retículo endoplasmático liso y rugoso (Zierdt, 1991a; Boreham y Stenzel, 1993a). Además, presenta distintas formas delimitadas por una membrana bilaminar, con la excepción de la forma quística (Zaman et al., 1995). En cuanto a su fisiología, *Blastocystis* sp. tiene un crecimiento óptimo a 37°C y pH neutro, no crece en medios de cultivo para hongos, es resistente a los antifúngicos y sensible a medicamentos antiprotozoarios. Estas características demuestran la vinculación de este microorganismo con los protozoos más que con los hongos (Dunn y Boreham, 1991; Zierdt et al., 1995).

Tras la aceptación de *Blastocystis hominis* como protozoo, su posición dentro del Reino Protista se ha visto modificada a lo largo del tiempo. Zierdt y Tan (1976) lo describen como un esporozoario, proponiendo una nueva clase Blastocystea y un nuevo orden Blastocystida; posteriormente se evidencia la presencia de pseudópodos y su división mediante fisión binaria, por lo que se reclasifica en el subphylum Sarcodina (amebas) y se crea el suborden Blastocystina dentro del orden Amoebida (Zierdt, 1988). Más recientemente, tras observar la posibilidad de fisión múltiple y endodiogenia, Jiang y He (1993) proponen un nuevo subphylum Blastocysta, que incluye la clase Blastocystea, orden Blastocystida, familia Blastocystidae y género *Blastocystis*, siendo *Blastocystis hominis* la única especie.

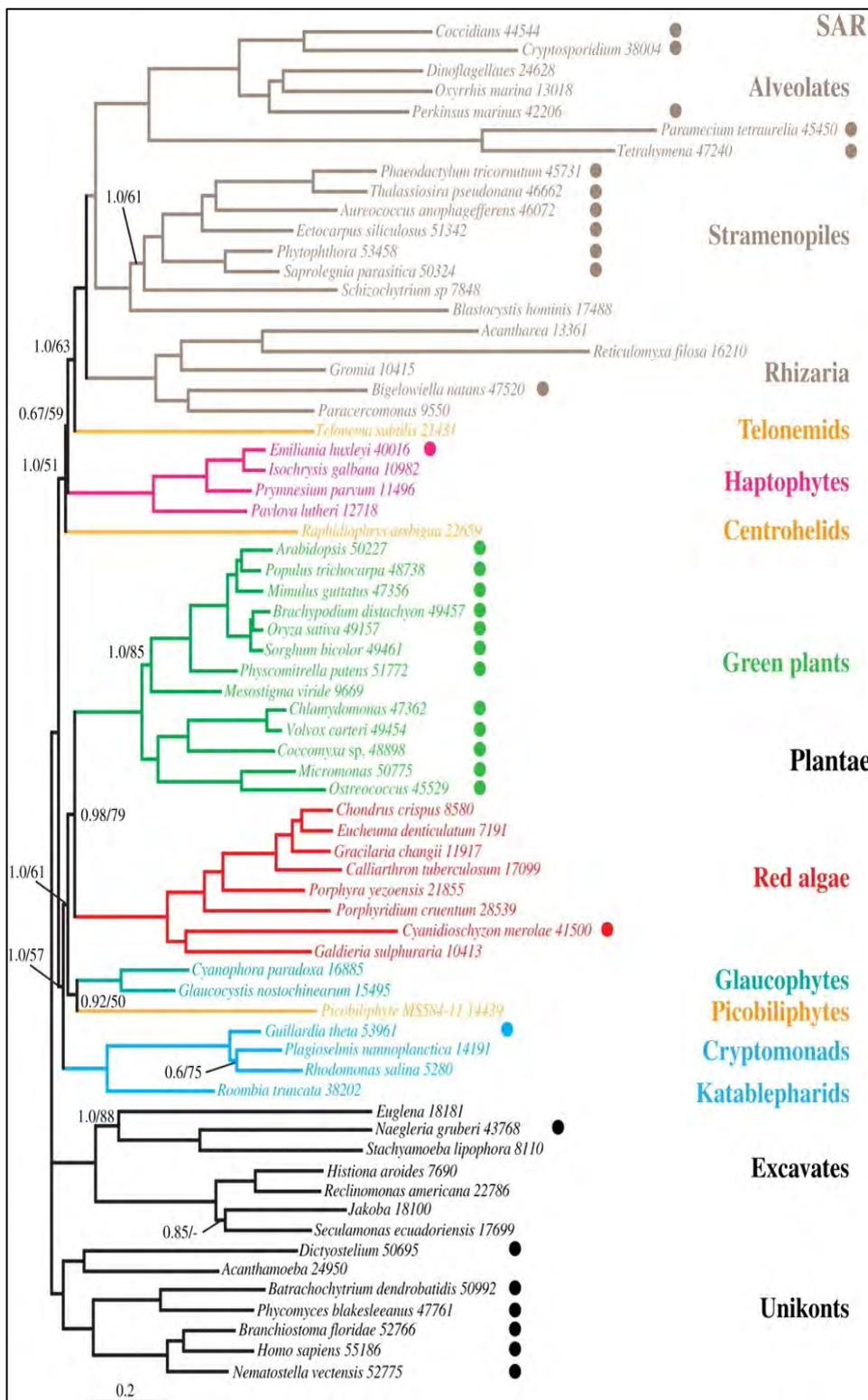
La aplicación de técnicas moleculares supuso una nueva aportación a los estudios taxonómicos de *Blastocystis* sp. basados exclusivamente en sus características morfológicas (Boreham y Stenzel, 1993a). Los primeros análisis filogenéticos fueron realizados por Johnson

et., al. (1989) quienes no encontraron relaciones monofiléticas al comparar la secuencia del gen SSU-rRNA del parásito con la de diferentes eucariotas, por lo que consideraron a *Blastocystis* sp. como una especie “incertae sedis” y la situaron como un grupo externo del clado que une ciliados y apicomplexa, resultados que fueron apoyados por otros autores (Hollebeke y Mayberry, 1994).

El uso de la secuencia de aminoácidos del factor de elongación-1 α (EF-1 α) para el análisis filogenético también demostró que *Blastocystis* no debe incluirse con los linajes fúngicos y sugiere que el parásito diverge antes que *Trypanosoma*, *Euglena*, *Dictyostelium* y otros eucariotas (Nakamura et al., 1996). Un estudio posterior en el que se utilizó EF-1 α para comparar el parentesco genético de *Blastocystis* de humanos y animales, demostró que el parásito diverge dentro del mismo grupo y los aislados pertenecían todos al mismo género (Ho et al., 2000). En contraste con los hallazgos realizados con SSU-rRNA, Ho et al., (2000) sugieren una aparición más temprana de *Blastocystis* sp. entre los eucariotas y un posible vínculo con Conosa, como *Entamoeba histolytica*. No obstante, esta discrepancia podría ser el resultado de un problema estadístico atribuido al bajo valor del bootstrap (58.1) utilizado para agrupar *Blastocystis* con *E. histolytica* (Tan et al., 2002).

Silberman et al., (1996) obtuvieron la secuencia completa del gen SSU-rRNA y demostraron que *Blastocystis* se sitúa dentro de los Stramenopiles y sorprendentemente está relacionado filogenéticamente con el flagelado *Proteromonas*, con el cual comparte características de su ciclo biológico. Este flagelado es un endosimbionte intestinal de vertebrados y se enquista a una forma resistente en el ambiente que permite la transmisión entre hospedadores. Sin embargo, *Blastocystis* no tiene flagelos o cilios tubulares, algo que lo diferencia de *Proteromonas*. En la actualidad está clasificado dentro del phylum *Stramenopiles*, clase *Blastocystae*, orden *Blastocystida* y familia *Blastocystidae*. La Figura 1 muestra la posición filogenética cercana de Stramenopiles con los Alveolates (que incluyen ciliados y apicomplexa) y Rhizaria (que incluyen foraminíferos y otros protozoos de vida libre).

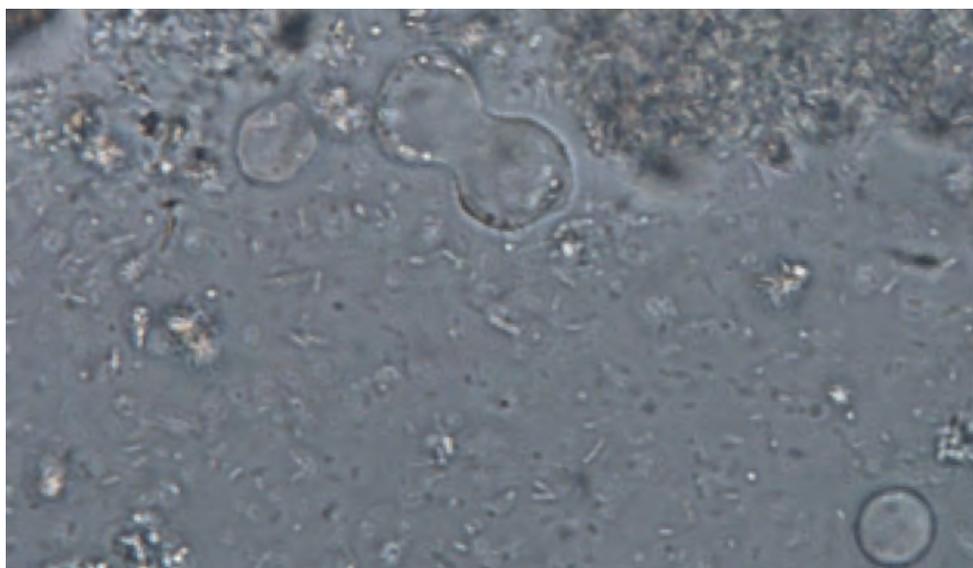
Figura 1 Posición filogenética de *Blastocystis* sp. (Burki et al., 2012)



1.3. Ciclo biológico

A día de hoy no se conocen con exactitud el ciclo de vida de *Blastocystis* sp. y todas las vías de transmisión, aunque a lo largo de la historia se han realizado diversas propuestas sobre la forma de división de este parásito. Ya en 1911, Alexeieff sugiere un ciclo biológico complejo, con fisión binaria de una etapa binucleada (división plasmotómica) y autogamia, un fenómeno sexual para producir quistes primarios, que a su vez crean esporas por gemación múltiple y se las considera formas resistentes. Este mismo autor propuso otro modo de reproducción, la merogonia, cuya validez fue cuestionada por diversos investigadores, aunque algunos aceptaron la división por fisión binaria (Zierdt, 1991a; Boreham y Stenzel, 1993a) (Figura 2).

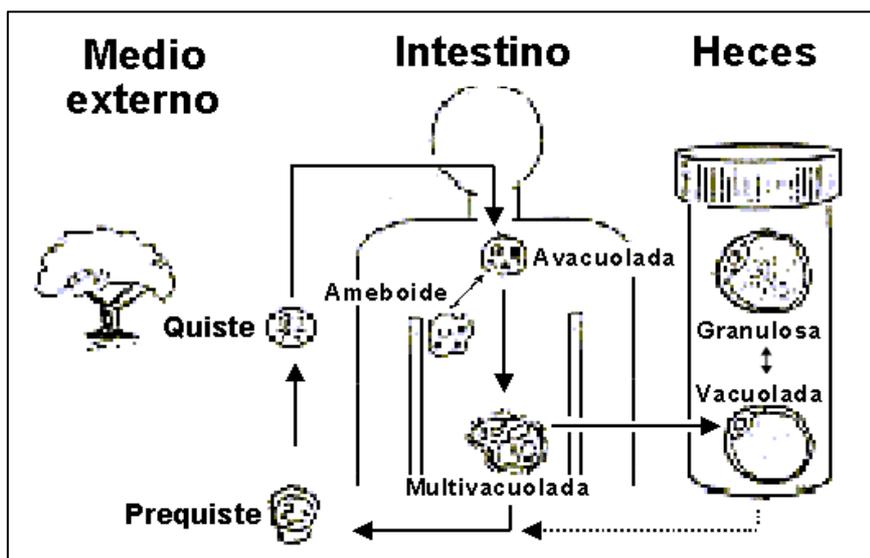
Figura 2. Fisión binaria de células de *Blastocystis* sp. en cultivo de medio de Jones (imagen propia)



Zierdt (1973) también postuló un ciclo biológico para *Blastocystis* en base a sus estudios microscópicos. Este autor observó que el parásito puede adoptar diversas morfologías, con una forma vacuolar que puede evolucionar a otros dos estadios, una forma granular que libera células hijas vacuolares dentro de la vacuola central, o una forma ameboidea, que produce células hijas vacuolares por división en gemación. La validez de la forma ameboide fue cuestionada dos décadas más tarde y se desconoce si ésta puede dividirse por fisión binaria (Boreham y Stenzel, 1993a). Unos años después, Zierdt (1991a) describió cuatro formas asexuales de multiplicación de *Blastocystis* (fisión binaria, plasmotomía, endodiogenia y esquizogonia), aunque no se aportan los nexos entre estas formas de división y el ciclo biológico y tampoco se evidencia en su estudio una posible reproducción sexual de *Blastocystis*.

Stenzel y Boreham (1991) y Boreham y Stenzel (1993b) proponen otro modelo de ciclo vital al observar diversas formas del parásito obtenidas de colonoscopias, heces y cultivos. Según estos autores, en el colon humano la forma predominante es la avacuolada sin una capa superficial. Esta forma progresa por el colon donde se fusionan pequeñas vesículas formando el estadio multivacuolar que se observan en las heces. Asimismo, a partir de esta forma se producirían formas ameboides o quistes, siendo estos últimos el estadio de transmisión más probable de *Blastocystis*. Siguiendo el razonamiento de los investigadores, es probable que la forma amebode se desarrolle a partir de la forma avacuolar, ya que existen semejanzas morfológicas como describen Dunn et al., (1989). En cambio, la forma vacuolar se observaría en el cultivo a partir de la forma multivacuolar. Se menciona que la forma granular procedería de la forma vacuolar con la presencia de gránulos en el cuerpo central. En definitiva, estos autores sugieren que la formas granulares y vacuolares tienen escasa importancia en la transmisión de *Blastocystis*, que recaería fundamentalmente en las formas quísticas, propuesta apoyada por Suresh et al., (1993) quienes demostraron que la forma quística es infecciosa en las ratas (Figura 3).

Figura 3 Ciclo vital de *Blastocystis* propuesto por Boreham y Stenzel (1993b)

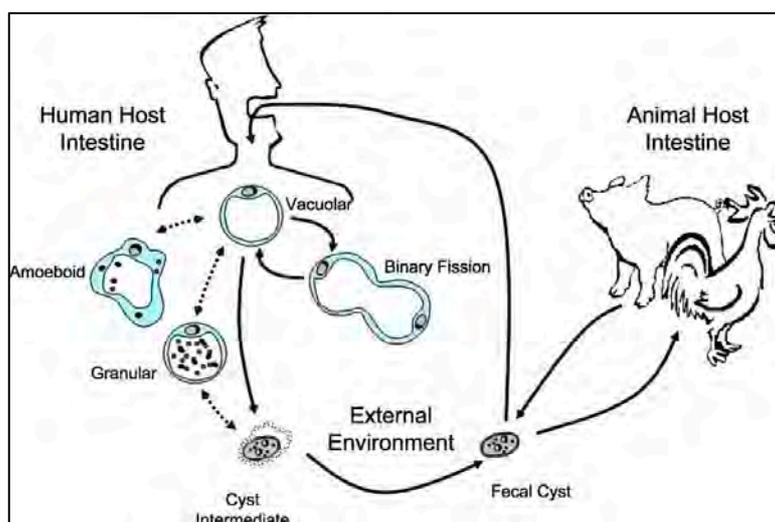


Otra variante del ciclo vital de *Blastocystis* fue propuesto por Singh et al., (1995) e involucra la existencia de quistes de pared gruesa y delgada. Los primeros serían responsables de la transmisión exógena a través de la ruta fecal-oral, mientras que los quistes de pared delgada serían auto infectantes permitiendo la multiplicación del microorganismo dentro del intestino. Según estos autores, la descendencia surge por esquizogonia dentro de la forma prequística, lo que da como resultado un quiste de pared gruesa, que a su vez se rompe para

liberar formas vacuolares hijas. Estos autores consideraron que la forma de esquizogonia expuesta por Zierdt, (1991a) se correspondería con la forma granular, que origina las formas quísticas de pared delgada. Sin embargo, este ciclo fue rechazado por Stenzel y Boreham (1996) reafirmando el ciclo de vida que ellos propusieron anteriormente (Boreham y Stenzel, 1993a).

Govind et al., (2002) revisaron las diversas hipótesis y propuestas de ciclo biológico y concluyen que es posible que *Blastocystis* posea diversos modos de replicación (fisión binaria, esquizogonia, gemación, bolsas en forma de saco) que a su vez le permiten sobrevivir en una amplia variedad de animales. De hecho, la aplicación de técnicas moleculares y estudios filogenéticos que implican a *Blastocystis* como organismo zoonótico ha llevado a proponer un ciclo biológico en el que se incorporan animales. Como se describe en la Figura 4, Tan (2004) sugiere que la infección en humanos y animales se produce por ingestión de quistes, los cuales evolucionan a formas vacuolares que se reproducen por fisión binaria. Algunas formas vacuolares se enquistan y estos quistes fecales pierden su capa fibrilar externa a medida que maduran. La transición de la forma vacuolar a los otros estadios que presenta el parásito se comprende menos y se representa con líneas discontinuas. Este mismo autor indica que no hay evidencias de reproducción sexual. En definitiva, las propuestas de los distintos investigadores anteriormente mencionados revelan que hoy en día todavía no existe consenso sobre el ciclo biológico de *Blastocystis*, aunque la mayoría de los modelos coinciden en afirmar que la transmisión se produce mediante las formas quísticas.

Figura 4 Ciclo vital de *Blastocystis* sp. propuesto por Tan (2004)

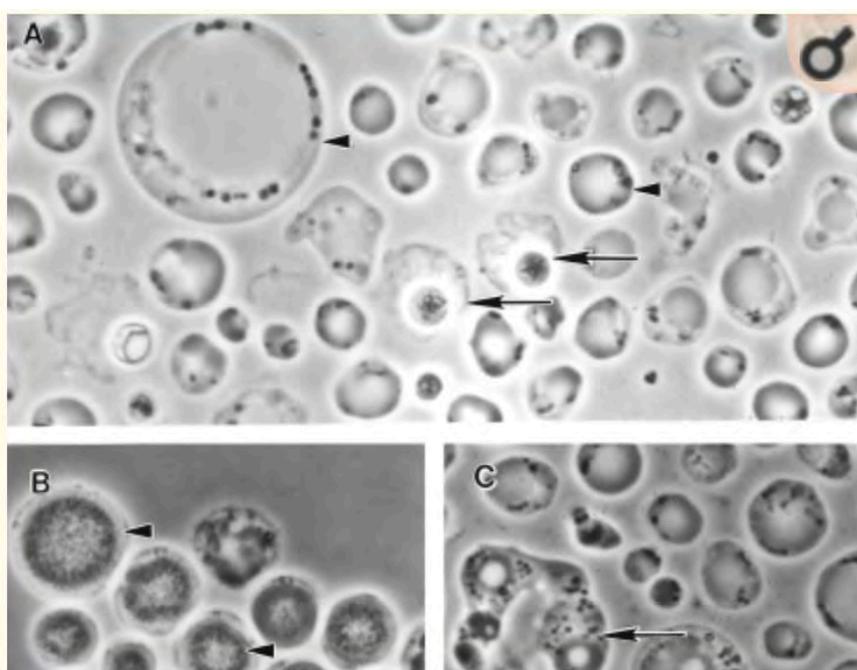


1.4. Morfología

Blastocystis sp. es un organismo eucariota polimórfico, habiéndose descrito hasta el momento cuatro variantes morfológicas: forma vacuolar, granular, ameboide y quística (Tan et al., 2002). No obstante, investigaciones con muestras fecales humanas y de otros hospedadores han demostrado que existen otras formas del parásito (avacuolares y multivacuolares), si bien éstas no se consideran en las pruebas diagnósticas (Boreham y Stenzel, 1993a; Zaman et al., 1995). Algunos estudios señalan el predominio de formas vacuolares en heces formadas y de formas ameboides en heces diarreicas (Carbajal et al., 1997), mientras que otros señalan el predominio de formas quísticas (Boreham et al., 1996).

El método más rápido y sencillo para identificar *Blastocystis* en muestras fecales es la microscopía óptica y la sensibilidad se incrementa cuando se utilizan métodos de concentración y cultivo (Zaman y Khan, 1994). No obstante, el microscopio electrónico ha resultado decisivo para conocer la biología celular y su ciclo vital. Los estudios ultraestructurales confirman que existen diversas variantes morfológicas de *Blastocystis*, dependiendo de las condiciones ambientales, si bien la morfología *in vivo* e *in vitro* puede verse afectada por factores físicos, como cambios osmóticos o la presencia de ciertos fármacos (Boreham y Stenzel, 1993a; Stenzel y Boreham, 1996) (Figura 5).

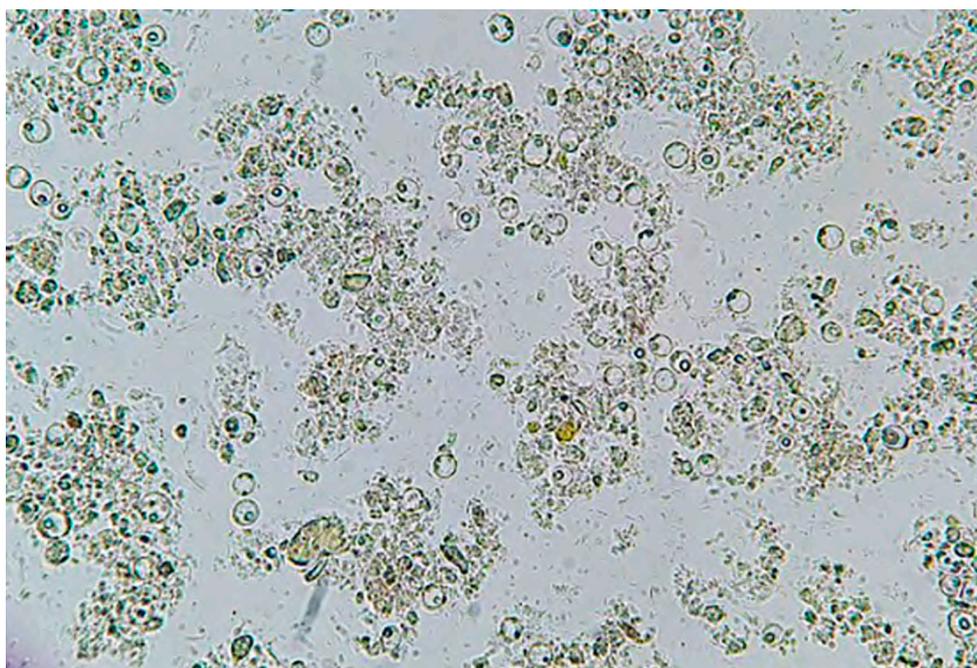
Figura 5 Morfología de *Blastocystis* sp. con microscópio de contraste de fases. A) Forma vacuolar y quiste, B) Forma granular y C) Forma ameboide (Tan, 2008)



1.4.1. Forma vacuolar

La forma vacuolar es la morfología predominante, tanto *in vivo* como *in vitro* (cultivo líquido axénico y xénico) por lo que se considera la célula típica de *Blastocystis* sp. (Zierdt., 1991a; Tan et al., 2002). En general es esférica y muestra forma redondeada en microscopía electrónica de transmisión, aunque presenta también formas irregulares (Boreham y Stenzel, 1993a). Su tamaño fluctúa desde 2 a 200 μm de diámetro con un promedio de 4-15 μm (Stenzel y Boreham, 1996). Tanto el núcleo como el citoplasma están desplazados a la periferia por la gran vacuola central que ocupa entre el 50% y 90% del volumen celular (Figura 6). Además, pueden contener hasta cuatro núcleos que están espaciados uniformemente alrededor de la célula (Zierdt, 1973). Esta forma vacuolar se reproduce rápidamente por fisión binaria (Zierdt, 1986).

Figura 6 Formas vacuolares de *Blastocystis* sp. mediante examen microscópico en fresco (imagen propia)



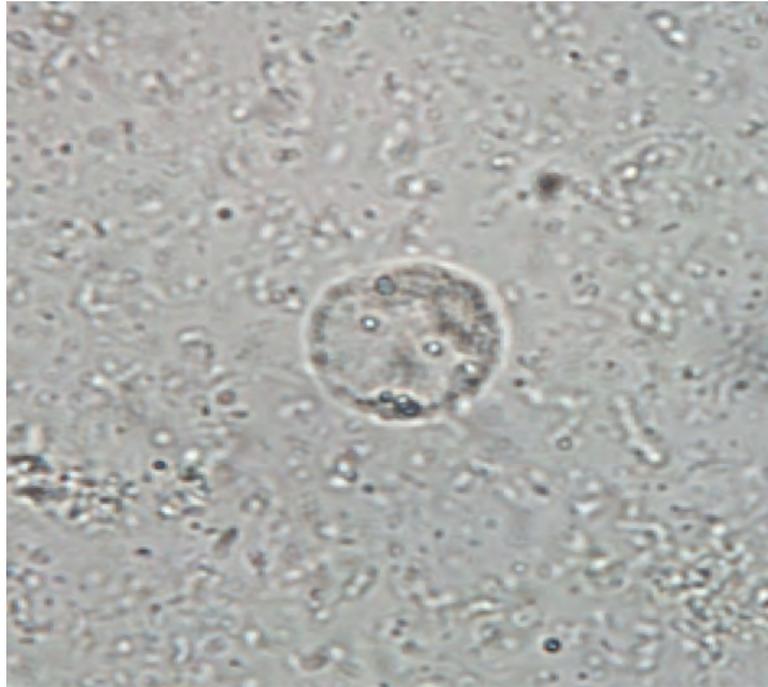
Bajo microscopía electrónica, la forma vacuolar contiene una gran vacuola y un borde delgado de citoplasma periférico, en el cual se observan orgánulos como el núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso y estructuras similares a las mitocondrias (Tan et al., 2001). Aún no está clara la función exacta de la vacuola central, al parecer actúa como orgánulo de almacenamiento o probablemente funciona en la reproducción (endodiogenia y

esquizogonia) a través del desarrollo de gránulos reproductivos, aunque este punto no ha sido confirmado (Suresh et al., 1994).

1.4.2. Forma granular

La forma granular se observa en cultivos antiguos y no axénicos (Tan, 2004) (Figura 7). Suele ser ligeramente más grande que la forma vacuolar, con un diámetro que oscila entre 15 y 25 μm (Zierdt, 1973), 3 y 38 μm (Tan et al., 1974) o 6,5 y 19,5 μm (Dunn et al., 1989). Su morfología es similar en apariencia a la forma vacuolar, exceptuando el contenido de la vacuola central. Las formas granulares también muestran una delgada banda periférica de citoplasma que rodea una gran vacuola central. A diferencia de la forma vacuolar, cuya vacuola central generalmente contiene material finamente granular que se dispersa por toda la vacuola, en la forma granular puede contener gránulos con distinta morfología (Dunn et al., 1989). En base a las observaciones al microscopio óptico se propusieron dos tipos de gránulos, uno de los cuales se convertiría en células hijas de *Blastocystis* mientras que el otro tendría un papel en el metabolismo (Zierdt et al., 1967). Posteriormente, con la ayuda de microscopía electrónica de transmisión se demostró la existencia de tres tipos de gránulos, descritos como gránulos metabólicos, lipídicos y reproductivos (Tan y Zierdt, 1973). Se propuso que los gránulos metabólicos eran citoplasmáticos, los gránulos lipídicos se encontraban en la vacuola central y el citoplasma, y los gránulos reproductivos estaban presentes en la vacuola central (Zierdt, 1973). Estas observaciones no han sido confirmadas y el estudio de Dunn et al., (1989) describieron inclusiones similares a la mielina, gránulos cristalinos, pequeñas vesículas y gotitas de lípidos en la vacuola central de formas granulares. Así mismo, se propone la fisión binaria como modo de reproducción de las formas granulares de *Blastocystis*.

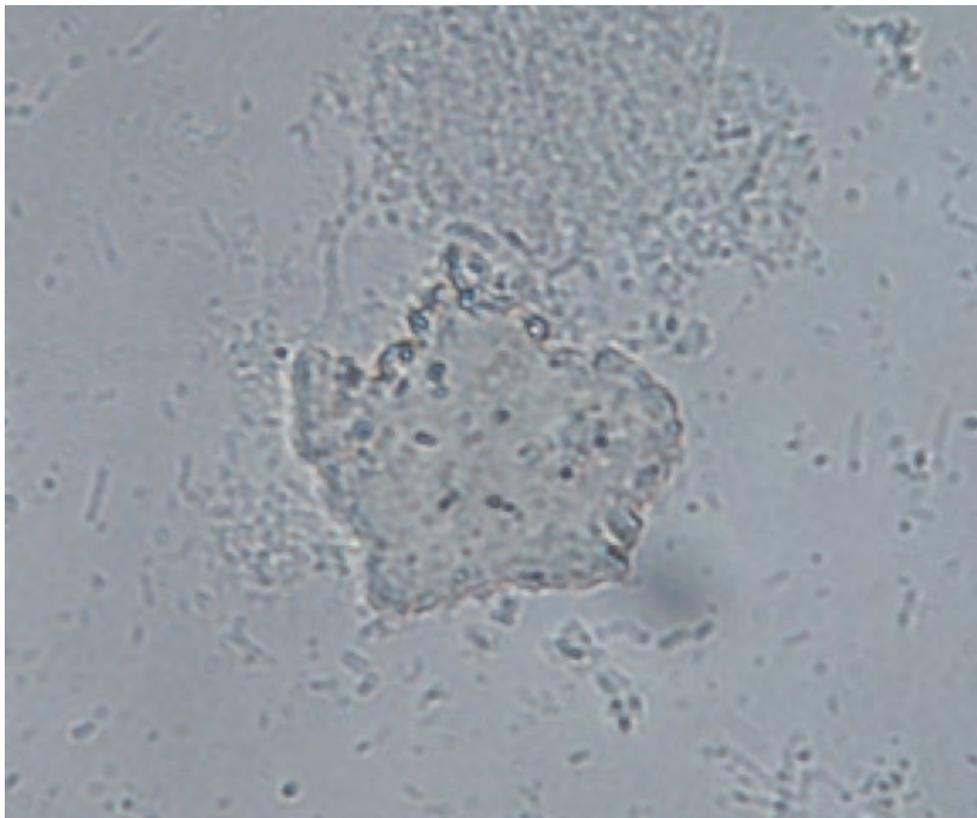
Figura 7 Forma granular de *Blastocystis* sp. en cultivo xénico (imagen propia)



1.4.3. Forma ameboide

Este morfotipo ha sido descrito en menor frecuencia y sus descripciones en la literatura son confusas (Tan et al., 1996). La forma ameboide de *Blastocystis* ha sido identificada en cultivos antiguos, tratados con antibióticos y ocasionalmente en pequeñas cantidades en muestras fecales obtenidas de pacientes con diarrea aguda (Carbajal et al., 1997) (Figura 8). Esta forma es más pequeña que las anteriores, su tamaño varía entre 2,6 μm y 7,9 μm ; no obstante, hay descripciones contradictorias de su morfología, especialmente usando microscopía electrónica (Tan et al., 2002).

Figura 8 Forma ameboide de *Blastocystis* sp. en cultivo xénico, se observan extensiones citoplasmáticas similares a pseudópodos (imagen propia)



Con el microscópio electrónico de transmisión se describe como una forma oval, con uno o dos pseudópodos grandes y carentes de membrana celular (Zierdt y Tan, 1976). Se considera una singularidad que una célula pueda sobrevivir sin membrana plasmática (Stenzel et al., 1993). Tan et al., (1996b) consiguió el crecimiento de colonias de células de *Blastocystis* partiendo del tipo ameboide, con un contorno irregular y extensiones pseudopódicas diversas (Tan et al., 2001). A diferencia de las observaciones de Dunn et al., (1989), quienes las describen como formas carentes de mitocondrias o vacuola central, el microscópio electrónico de transmisión mostró la existencia de vacuola central, numerosos cuerpos de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias en las extensiones pseudopódicas citoplasmáticas, todo lo cual revela que la célula realiza procesos activos que requieren energía.

No existen evidencias concluyentes sobre la forma en que se multiplican las células ameboides, aunque se ha sugerido la gemación y plasmotomía (Zierdt, 1991a). Se ha propuesto que las células ameboides son un estadio intermedio entre las formas vacuolares y los quistes y que la ingestión de bacterias o restos celulares procedentes de la muerte de células vecinas

desempeñaría un papel nutritivo o regulador para el proceso de enquistamiento (Singh et al., 1995).

1.4.4. Forma quística

Las primeras observaciones de formas quísticas de *Blastocystis* fueron realizadas por Mehlhorn (1988) en las heces frescas de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Sin embargo, la primera descripción morfológica completa de los quistes se debe a Stenzel y Boreham (1991) quienes lo observan en material almacenado durante muchos días antes de ser fijado y en cultivos de laboratorio. El quiste tiene forma redondeada y rara vez ovoide con microscopía electrónica de transmisión (Stenzel y Boreham, 1991).

Morfológicamente, los quistes fecales son esféricos u ovoides, presentan una pared quística multilaminada y raramente aparecen en cultivos axénicos. En el interior de la célula se observan de uno a cuatro núcleos, múltiples vacuolas, depósitos lipídicos y glucogénicos (Moe et al., 1999), así como múltiples orgánulos similares a mitocondrias (Zaman et al., 1995). Los quistes están rodeados de una capa fibrilar laxa que la pierden cuando maduran (Zaman et al., 1997). Además, su tamaño es menor que las formas vacuolares y granulares observadas en los cultivos. Se ha descrito un tamaño que oscila entre 5 y 10 μm (Mehlhorn, 1988), 3,7 y 5 μm (Stenzel y Boreham, 1991), 3 y 6 μm (Zaman et al., 1995) y de 2 a 5 μm (Moe et al., 1996) de diámetro.

Los quistes de *Blastocystis* no se lisan en el agua y sobreviven hasta 19 días a temperatura ambiente, pero son sensibles a las temperaturas extremas y desinfectantes comunes (Suresh et al., 1993; Zaman et al., 1995; Moe et al., 1996). En comparación con las formas quísticas, las formas vacuolar y granular son sensibles a los cambios de temperatura, también a los ambientes hipertónicos e hipotónicos y la exposición al aire, por lo que parece poco probable que estas dos formas proporcionen un modo de transmisión, que se realizaría fundamentalmente por medio de quistes (Zierdt, 1991a; Boreham y Stenzel, 1993a; Singh et al., 1995) (figura 9).

Figura 9 Forma de quiste de *Blastocystis* sp. (Tan, 2008)

1.4.5. Otras Formas

Diversos investigadores han descrito otras formas de *Blastocystis* diferentes a las anteriormente mencionadas. Concretamente, en un paciente con diarrea profusa se identificaron formas carentes de vacuola central, a las que se denominó avacuolares (Stenzel et al., 1991). Estos mismos autores señalan diferencias entre las formas aisladas de colonoscopias y las formas vacuolares y granulares convencionales o las de cultivo. Las células obtenidas de colonoscopia no poseen cubierta externa, tiene diferencias en la morfología de las mitocondrias y un diámetro de aproximadamente 5 μm .

Del mismo modo, se han descrito formas multivacuolares en heces humanas (Boreham et al., 1996). Estas células están rodeadas de una cubierta externa gruesa y presentan múltiples vacuolas de tamaño y contenido variables. También son de pequeño tamaño, con un diámetro que oscila entre 5 y 8 μm . Se sugirió que las formas avacuolares y multivacuolares representan el estadio *in vivo* del parásito, mientras que las formas vacuolar y granular se encuentran en los cultivos (Boreham y Stenzel, 1993a). Se propuso que la rotura de múltiples vacuolas en las formas multivacuolares formarían la vacuola central, siendo un estadio intermedio en la formación de quistes fecales. En cualquier caso, se considera que estas formas son estadios transitorios en el ciclo vital de *Blastocystis* sp. (Stenzel et al., 1991).

1.5. Mecanismos de transmisión

Las vías de transmisión de *Blastocystis* no se conocen en su totalidad, aunque las observaciones de brotes epidémicos familiares y en instituciones cerradas apoyan la transmisión fecal-oral (Yoshikawa et al., 2004b; Paulos et al., 2018). La contaminación del medio ambiente, los alimentos o el agua con quistes excretados por los hospedadores también se consideran formas de contagio (Leelayoova et al., 2008; Baldursson y Karanis, 2011). Concretamente, se ha informado de la transmisión a través de agua sin hervir y sin potabilizar, así como por malas condiciones sanitarias e higiénicas (Stensvold et al., 2009c; Cohen y Colford, 2017). Taamasri et al., (2000) asociaron la infección con la mala calidad del agua y otros autores observaron que este parásito se transmite por la ingesta de agua, frutas o vegetales contaminados con excrementos de animales (Smith y Nichols, 2006; Noradilah et al., 2017). Un estudio reciente sugiere que el suelo puede ser otra vía de transmisión, lo que debería ser considerado en futuras investigaciones (Jinatham et al., 2021).

Ruauy y Stang (2014) observaron que las personas en contacto con animales tienen más probabilidades de contraer la infección por *Blastocystis* y describen la existencia de reservorios animales, la posibilidad de transmisión interhumana a través de las manos, así como las relaciones orogenitales y oroanales (Belleza et al., 2015; Oliveira-Arbex et al., 2018; Köster et al., 2021). Suresh et al., (1993) comprobaron que los animales inoculados con quistes de *Blastocystis* excretaban trofozoítos en las heces. Además, Pintong et al., (2018) sugieren que el contacto cercano o la exposición a las heces de los cerdos puede ser una fuente de contagio en los manipuladores de estos animales, a los que consideran reservorios, papel similar al asignado a las ratas de alcantarilla por Galán-Puchades et al., (2021). En España, las primeras referencias a la infección por *Blastocystis* sp. en animales se realizan en cerdos y vacas, habiéndose denunciado su presencia en más del 50% y 10% de las explotaciones porcinas y bovinas, respectivamente (Quílez et al., 1995b, 1995a).

Con el uso de las técnicas moleculares se postuló la idea de que esta parasitosis es una zoonosis, con variaciones intraespecíficas en aislados de *Blastocystis* sp. procedentes de diferentes hospedadores (Bahrami et al., 2020; Hublin et al., 2021; Rudzińska et al., 2021), aunque otros estudios no han establecido esta relación zoonótica (Paulos et al., 2018). Por su parte, Yoshikawa et al., (2000) consideran que la infección por *Blastocystis* es una antropozoonosis, confirmando la transmisión interhumana al comparar el genoma de cepas obtenidas de dos centros de salud.

1.6. Epidemiología y prevalencia

Blastocystis sp. tiene distribución cosmopolita y se considera el parásito más prevalente en muestras fecales humanas, tanto en pacientes sintomáticos como en individuos sanos (Roberts et al., 2011; Badparva et al., 2014). Se estima que más de mil millones de personas están infectadas en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde se suelen notificar porcentajes de infección superiores al 50%, e incluso hasta el 100% en algunos países tropicales (Tan, 2008; El Safadi et al., 2014; Torgerson et al., 2015). Por el contrario, la prevalencia es significativamente menor en los países desarrollados (10-15%) (Tan, 2004).

La elevada prevalencia de este protozoo en los países en desarrollo está relacionada con las deficiencias en las infraestructuras y prácticas sanitarias y el consumo de alimentos o agua que estén contaminados (Belleza et al., 2015; Osman et al., 2016; Heydari-Hengami et al., 2018). Por lo tanto, la prevalencia puede ser reflejo de factores socioeconómicos, geográficos y condiciones sanitarias de una población, que conducen a un saneamiento deficiente y a un aumento de las fuentes potenciales de infección, incluida la transmisión de persona a persona, zoonótica y a través del agua (Javanmard et al., 2018; Oliveira-Arbex et al., 2018).

No obstante, en los países desarrollados también se registran altas tasas de parasitación por *Blastocystis*. Entre los colectivos más afectados se incluyen inmigrantes, refugiados, niños adoptados de los países en desarrollo, así como viajeros y personas que viven en estrecho contacto con animales, que se han sugerido como fuente de infección para el ser humano (Salvador et al., 2016; Javanmard et al., 2018). En la tabla 1 se indica la prevalencia de *Blastocystis* registrada en diversos países.

Tabla 1 Prevalencia de infección por *Blastocystis* sp. en diferentes países adaptado de Alfellani et al., (2013)

Prevalencia (%)	País	Referencia
0,5	Japón	(Horiki et al., 1997)
2,1	Turquía	(Köksal et al., 2010)
3,2	Canadá	(Doyle et al., 1990)
3,3	Singapur	(Wong et al., 2008)
3,7	China	(Wang et al., 2002)
7	México	(Diaz et al., 2003)
7	España	(González-Moreno et al., 2011)
8	Canadá	(Senay y MacPherson, 1990)
9,18	España	(Matovelle et al., 2022)
11,3	Alemania	(Jelinek et al., 1997)
13	España	(Muadica et al., 2020)
13,2	Qatar	(Abu-Madi et al., 2008)
13,5	Tailandia	(Yaicharoen et al., 2006)
13,6	Italia	(Cirioni et al., 1999)
14,1	Taiwan	(Cheng et al., 2003)
14,2	Turquía	(Östan et al., 2007)
14,7	India	(Rayan et al., 2010)
14,9	Malasia	(Suresh et al., 2001)
15	Alemania	(Paschke et al., 2011)
16,3	Egipto	(Sanad et al., 1991)
16,5	España	(Carbajal et al., 1997)
19	Lebanon	(Yakoob et al., 2014)
20	EEUU	(Amin, 2002)
22,1	Libia	(Abdulsalam et al., 2013b)
22,9	Argentina	(Minvielle et al., 2004)
24	Países Bajos	(Bart et al., 2013)
25	Jordania	(Nimri, 1993)
25	Perú	(Robles-Cabrera et al., 2021)
26,5	Brasil	(Nascimento y Moitinho Mda, 2005)
26,6	Libia	(Alfellani et al., 2013c)
27,4	Tailandia	(Menounos et al., 2008)
32,6	China	(Mirza et al., 2012)
35,2	España	(Paulos et al., 2018)
36,4	Colombia	(Londoño et al., 2009)
38,8	Guatemala	(Figueroa et al., 2017)
40,7	Filipinas	(Baldo et al., 2004)
40,9	Brasil	(Aguiar et al., 2007)
52,3	Malasia	(Noor Azian et al., 2007),
53,8	Zambia	(Boorom et al., 2008)
61,8	Chile	(Torres et al., 1992)
100%	Senegal	(El Safadi et al., 2014)

Cabe señalar que son varios los factores que dificultan los estudios comparativos, entre los cuales cabe mencionar el uso de diferentes herramientas diagnósticas en los laboratorios de microbiología clínica, considerándose que en muchos casos hay una subestimación de las cifras reales (Alfellani et al., 2013a; Stensvold and Clark, 2016). De hecho, en la mayoría de trabajos el diagnóstico se basa en el reconocimiento de formas vacuolares, pudiendo por tanto pasarse por alto otras formas del parásito (Robles-Cabrera et al., 2021). La dificultad para comparar los resultados de distintos estudios también estaría relacionada con diferencias en la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas en las personas analizadas. De hecho, muchos trabajos no proporcionan suficientes detalles sobre los pacientes elegidos y mientras que algunos informan del número de pacientes, otros se refieren al número de muestras fecales siendo varias las analizadas por paciente (González-Moreno et al., 2011).

Estas diferencias son visibles cuando se comparan estudios realizados en el mismo país. Por ejemplo, los hallazgos de Köksal et al., (2010) en Turquía sobre muestras de pacientes analizadas en laboratorio señalan una prevalencia de parasitación por *Blastocystis* de 4%, mientras que la cifra se incrementa a 31% cuando se investigaron niños en una escuela primaria (Östan et al., 2007). En Malasia, el estudio de Suresh et al., (2001) en individuos de un área urbana señala una prevalencia de 27,9%, cifra que se incrementa significativamente según datos de Noor Azian et al., (2007) cuando se investiga una comunidad aborígen.

Un estudio reciente fue el primero en mostrar los fuertes efectos que el Índice de Desarrollo Humano (IDH), un indicador nombrado por las Naciones Unidas (ONU), tiene sobre la prevalencia de *Blastocystis* (Javanmard et al., 2018). El IDH se utiliza para clasificar a los países en función de su renta, calidad y esperanza de vida y educación. Factores socioeconómicos como la calidad del agua, el contacto con animales y las condiciones sanitarias se han relacionado con la prevalencia de *Blastocystis* (Anuar et al., 2013). El agua se considera una posible fuente de transmisión de *Blastocystis* dada la viabilidad y resistencia de los quistes (Baldursson y Karanis, 2011). El consumo de agua no tratada o hervida se ha relacionado con un mayor riesgo de contraer la infección, tanto en países desarrollados como en aquéllos en vías de desarrollo (Cotruvo et al., 2004; Leelayoova et al., 2008; Fletcher et al., 2012), al igual que las condiciones higiénicas deficientes (Rebolla et al., 2016).

La infección por *Blastocystis* también se ha asociado en ocasiones a otros parásitos como *Trichomonas hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis* (Leelayoova et al., 2008; Coyle et al., 2012). Además, se ha demostrado que las personas que

están en estrecho contacto con animales, incluyendo los profesiones que los manipulan, tienen mayor riesgo de infectarse con *Blastocystis*, lo que refuerza la hipótesis de que se trata de una infección zoonótica (Oliveira-Arbex et al., 2019). Entre los animales de compañía, la tenencia de perros se ha descrito como un factor de riesgo potencial para sufrir la infección (Belleza et al., 2015). En cuanto a los animales domésticos de granja, también se ha demostrado el potencial de los cerdos como reservorios zoonóticos (Yan et al., 2007).

Otro factor que condiciona la prevalencia es la edad, aunque los resultados son en muchas ocasiones contradictorios. En varios estudios se han observado valores más altos en adultos que en niños (Abdulsalam et al., 2013b; Robles-Cabrera et al., 2021) y especialmente en adultos jóvenes (González-Moreno et al., 2011; Salvador et al., 2016). En otras ocasiones se ha señalado que los niños tienen mayor riesgo de infectarse por *Blastocystis* sp. debido a la ausencia de infecciones previas y diferencias en comportamientos y hábitos (Stensvold y Clark, 2016; Ramírez et al., 2017). En países en vías de desarrollo se han citado porcentajes de parasitación muy elevados en población infantil (68-100 %) (El Safadi et al., 2014; Dib et al., 2015). En un estudio se observó la reducción significativa de la prevalencia en niños al incrementarse su edad (El Safadi et al., 2016), pero en otro se señala que los niños de mayor edad son más propensos a albergar el parásito que los más jóvenes (Muadica et al., 2020). Por su parte, Rayan et al., (2010) señala que los parásitos intestinales, incluido *Blastocystis* sp., son más frecuentes en niños de zonas rurales que de zonas urbanas. Otros estudios muestran que la tasa de infección se reduce en adultos, posiblemente para volver a incrementarse cuando se alcanza la vejez (Suresh y Smith, 2004; Rossignol et al., 2005; Muñoz et al., 2008; Tan et al., 2010; Dumic et al., 2019).

La prevalencia de *Blastocystis* no muestra diferencias significativas cuando se comparan ambos sexos (Seyer et al., 2017; Lhotská et al., 2020; Guilavogui et al., 2022), aunque algunos estudios han mostrado mayor presencia del parásito en mujeres (Abu-Madi et al., 2008; Kosik-Bogacka et al., 2021) y otros en hombres, circunstancia esta última atribuida a que realizan actividades al aire libre con más frecuencia (Abdulsalam et al., 2013b; Wakid et al., 2022). Otro estudio ha notificado diferencias de casi 2:1 entre niñas y niños, pero no se ha determinado si este resultado es estadísticamente significativo (Monjaraz et al., 2018). Por otra parte, algunos autores no han encontrado ninguna correlación entre la infección y el sexo (Beyhan et al., 2015). Sin embargo, se considera que las diferencias en el tipo de trabajo realizado por hombres y mujeres, junto con factores ambientales, ecológicos, económicos y culturales, pueden afectar al riesgo de infección por *Blastocystis* sp. En los países en los que la brecha entre géneros es mayor,

las oportunidades educativas, el estado nutricional y el acceso a los servicios médicos pueden tener incluso una mayor importancia (Ghimire et al., 2016).

La infección por *Blastocystis* parece ser frecuente en pacientes inmunodeprimidos, especialmente los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), receptores de trasplantes de órganos o afectados de cáncer (Boorom et al., 2008; Kurniawan et al., 2009; Wawrzyniak et al., 2013; Mohtashamipour et al., 2015; Piranshahi et al., 2018). Además, los niños de países en vías de desarrollo, si están inmunodeprimidos y padecen diarrea crónica también son más receptivos a padecer la infección (Calik et al., 2011; Daryani et al., 2012). No obstante, se dispone de datos limitados sobre la prevalencia y la importancia de las infecciones por *Blastocystis* en pacientes inmunodeprimidos, tanto con infección por VIH como sin ella, y no se han realizado estudios comparativos exhaustivos con personas inmunocompetentes.

La presencia de *Blastocystis* también se ha relacionado con las condiciones climáticas, siendo la infección aparentemente más frecuente en épocas cálidas. Según Suresh y Smith (2004) la infección es más frecuente en verano que en invierno o primavera, aunque en España se observó un máximo en adultos durante la primavera (González-Moreno et al., 2011), mientras que otro estudio en Francia señala un pico más alto en verano y otro en Estados Unidos una mayor prevalencia entre julio y octubre (Amin, 2002). Según los autores, los motivos que justifican estas diferencias podrían estar relacionados con el comportamiento de las personas, que realizan más picnics y barbacoas en las épocas cálidas y consumen verduras crudas que podrían estar contaminadas con *Blastocystis*. Además, las personas viajan más en verano, especialmente a países tropicales donde el nivel de higiene se considera más deficiente y podrían infectarse al ingerir alimentos o agua contaminadas, o incluso nadando en los ríos. De hecho, se ha observado que los pacientes con antecedentes de viajes recientes a países de renta baja presentan mayor prevalencia (Bart et al., 2013).

El mayor contacto en las épocas del año más cálidas con animales en granjas y zoológicos también se ha señalado como factor de riesgo (Sahimin et al., 2020). No obstante, otros estudios han indicado que la infección por *Blastocystis* es más frecuente en la estación lluviosa (15,7%) (octubre - noviembre) en comparación con la estación seca (13,9%) (junio) (Noradilah et al., 2017b; Sylla et al., 2022) y otros no encuentran diferencias significativas (Salvador et al., 2016). En cualquier caso, estos datos deben interpretarse con precaución, ya que las diferencias estacionales entre lugares geográficos a veces distantes dependen de una gran variedad de factores, más que de la estación en sí (González-Moreno et al., 2011).

1.7. Patogenicidad

Un aspecto especialmente debatido durante mucho tiempo está relacionado con la patogenicidad de *Blastocystis* sp. y la dificultad para responder incluso hoy en día si este protozoo es verdaderamente patógeno o comensal, o bien sólo es patógeno en situaciones concretas como estados de inmunosupresión, malnutrición o infecciones recurrentes (Scanlan et al., 2014; Stensvold y van der Giezen, 2018; Kim et al., 2020; Shirvani et al., 2020). En muchos casos de diarrea no se investigaron todas las causas infecciosas y no infecciosas, por lo que los resultados al respecto no son concluyentes; de hecho, las estimaciones indican que la etiología de la diarrea es desconocida en aproximadamente un 25% de los pacientes afectados (Stensvold et al., 2020).

A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios comparando la presencia o ausencia del parásito en grupos de pacientes sintomáticos y asintomáticos. No obstante, los resultados están condicionados por factores diversos que en ocasiones eran desconocidos, como la duración del estado de portador, periodo de incubación, características del cuadro clínico (agudo, intermitente, crónico), etc. Además, las herramientas diagnósticas no fueron las mismas en todos estos estudios, por lo que determinadas formas de *Blastocystis* sp. pudieron pasar por alto cuando se usan técnicas como la microscopía óptica. En este sentido, se recomienda el uso del cultivo por su mayor sensibilidad, aunque su utilidad es limitada en la rutina diaria de los laboratorios clínicos de diagnóstico (Tan, 2004).

En la evolución de las infecciones por *Blastocystis* sp. puede resultar decisiva tanto la receptividad del hospedador como la patogenicidad del parásito (Tan et al., 2010; Fletcher et al., 2012). Este microorganismo podría formar parte de la microbiota intestinal de individuos sanos (asociado sobre todo con *Rumicoccus* spp. o *Prevotella* spp.), pues se han descrito portadores asintomáticos durante periodos superiores a 10 años. En este sentido, algunos autores consideran que la presencia de *Blastocystis* sp. podría incluso reducir la incidencia de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en determinados individuos, puesto que el parásito provoca la liberación de IL-22, que estimula la secreción mucosa en el intestino produciendo alivio de los síntomas de colitis; además, *Blastocystis* puede participar en procesos metabólicos del hospedador como la descomposición de la celulosa (Moosavi et al., 2012; Andersen y Stensvold, 2016; Lepczyńska et al., 2017). Otros estudios también concluyen el carácter comensal de *Blastocystis*, al constatar que la presencia de síntomas gastrointestinales es similar

en personas positivas y negativas y la mayoría de infectados son asintomáticos (Cheng et al., 2003; Yowang et al., 2018; Mardani Kataki et al., 2019).

La presencia de *Blastocystis* sp. también se ha relacionado con diversos trastornos intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome de intestino irritable y un bajo índice de masa corporal. Algunos autores sugieren que *Blastocystis* sp. puede alterar la composición de la microbiota intestinal y favorecer la infección gastrointestinal, lo que a su vez puede tener un efecto negativo en la respuesta inmunitaria del hospedador. Sin embargo, no está claro si estos efectos también ocurren en seres humanos y se necesitan más estudios para determinar la relación entre *Blastocystis* sp. y estos trastornos (Parija y Jeremiah, 2013; Nourrisson et al., 2014; Scanlan et al., 2014).

En ocasiones, las conclusiones sobre la patogenicidad de *Blastocystis* sp. han estado basadas en casos individuales. Boreham y Stenzel (1993a) o Vogelberg et al., (2010) informaron que la resolución de los síntomas coincide con la eliminación del parásito, lo que sugiere que podría ser la causa de la patología, aunque excluyeron la presencia de otros patógenos (Moghaddam et al., 2005). Conclusiones similares fueron aportadas por otros investigadores, al constatar que el uso de fármacos frente a *Blastocystis* reduce los síntomas y elimina el parásito en pacientes con diarrea aguda, incluidos algunos que habían sido tratados con prednisona para la artritis reumatoide (Lee et al., 1990; Moghaddam et al., 2005; Rossignol et al., 2005; Kaya et al., 2007; Ertuğ et al., 2009; Parija y Jeremiah, 2013; Nourrisson et al., 2014; Scanlan et al., 2014).

Un consenso postulado por muchos investigadores consiste en reconocer a *Blastocystis* sp. como patógeno cuando no se identifica ningún otro microorganismo causante de enfermedad intestinal en los pacientes (bacteriano, vírico o parasitario) y se observan más de 5 formas en cada campo microscópico (40x) (Zierdt, 1991a; Stenzel y Boreham, 1996; Carbajal et al., 1997; Kaya et al., 2007). Algunos estudios han relacionado el número de *Blastocystis* identificados en la muestras fecales y la presencia de síntomas (Seguí et al., 2017; Robles-Cabrera et al., 2021) pero otros no han encontrado ninguna correlación (Vargas-Sanchez et al., 2015; Rudzińska et al., 2019) o consideran a *Blastocystis* sp. como un patógeno potencial independientemente del número de parásitos por campo (Mohemmi et al., 2015).

La patogenicidad de *Blastocystis* también se ha intentado relacionar con determinadas formas del ciclo vital, tanto en muestras fecales como en cultivos *in vitro*. Concretamente, la forma ameboide es una de las etapas que se encuentra en porcentajes más altos en cultivos *in*

vitro de aislados de pacientes sintomáticos, en comparación con aislados obtenidos de individuos asintomáticos (Tan y Suresh, 2006a, 2006b). También se ha observado que la morfología ameboide predomina sobre la vacuolar en los lavados colonoscópicos y pacientes con síndrome diarreico agudo (Tan y Suresh, 2006b; Zhang et al., 2012) y su presencia se ha relacionado con la aparición de urticaria en determinados pacientes (Valsecchi et al., 2004; Tan y Suresh, 2006b; Abdel-Hameed et al., 2011).

Otro aspecto ampliamente investigado son las diferencias en la patogenicidad en función del subtipo (ST) de *Blastocystis*, aunque los resultados siguen sin ser concluyentes. Esta observación fue avanzada por Clark (1997) y autores como Kaneda et al., (2000) ya propusieron que los ST1, ST2 y ST4 podrían ser responsables de síntomas gastrointestinales. Algunos investigadores han registrado una mayor frecuencia de ST1 y ST2 en pacientes con síntomas gastrointestinales en comparación con el grupo control (Yan et al., 2006; Stensvold et al., 2009a; Tan et al., 2010; Cakir et al., 2019). La variante ST2 se ha relacionado con la presencia de síntomas gastrointestinales y urticaria (Stensvold et al., 2010; Vogelberg et al., 2010) y este subtipo fue identificado en el 100% de pacientes con diarrea en Colombia, mientras que las personas asintomáticas estaban parasitadas por ST1 (Ramírez et al., 2014). No obstante, otros estudios no han confirmado la patogenicidad de ST2 (Yoshikawa et al., 2004a; Dogruman-Al et al., 2008).

La variante ST3 también se ha identificado en una mayoría de pacientes afectados de urticaria (Katsarou-Katsari et al., 2008; Abdel-Hameed et al., 2011) mientras que otros estudios identifican el subtipo ST4 como muy prevalente en pacientes con diarrea grave (Domínguez-Márquez et al., 2009; Stensvold et al., 2011a). Otros trabajos también han asignado poder patógeno a los subtipos ST5 (Alfellani et al., 2013b), ST6 (Rene et al., 2009; Dagci et al., 2014; Koltas and Eroglu, 2016) y ST7 (Poirier et al., 2012). El ST8 es poco frecuente en humanos, aunque en dos estudios también se ha relacionado con síntomas graves (Stensvold et al., 2008; Roberts et al., 2013).

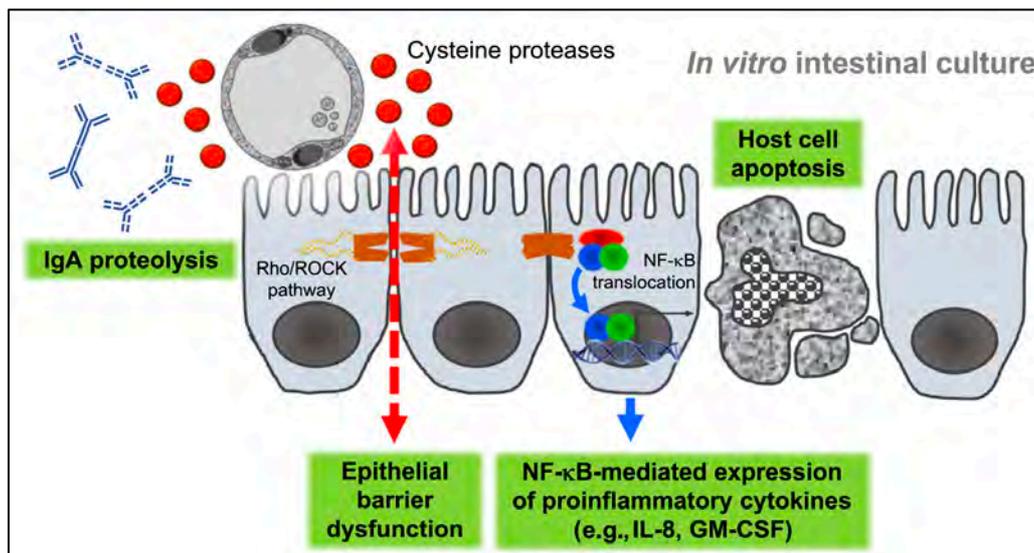
Las anteriores consideraciones revelan la ausencia de consenso en cuanto a la patogenicidad de los distintos subtipos de *Blastocystis*. De hecho, son también diversos los estudios donde no se encuentra una asociación estadística entre la distribución de diferentes subtipos y la presencia o ausencia de síntomas en los pacientes (Andiran et al., 2006; Özyurt et al., 2008; Dogruman-Al et al., 2009; Dogan et al., 2017).

1.8. Virulencia

Blastocystis sp. es un protista anaerobio extracelular que coloniza el intestino grueso (Pintong et al., 2018). Los estudios en modelos de roedores y cerdos infectados naturalmente han demostrado que el parásito se localiza en la luz y la superficie mucosa del intestino grueso principalmente en el ciego y el colon (Tan, 2008). Entre los mecanismos de patogenicidad se incluye la liberación de proteasas y hialuronidasa, por las cuales *Blastocystis* sp. invade y coloniza la lámina propia, submucosa y capa muscular de la mucosa del colon. La hialuronidasa despolimeriza el ácido hialurónico encargado del mantenimiento y estabilización de las proteínas de la matriz extracelular, por lo que se pierde la integridad de la mucosa intestinal y aumenta la permeabilidad. Este efecto está potenciado por las glicosil-transferasas que favorecen la fosforilación de la cadena ligera de miosina al activar la Rho quinasa, con la consecuente formación de fibras de actina de estrés que aumentan la contracción de las fibras de actomiosina ancladas a las uniones estrechas. La tripticasa de mastocitos y proteasas como la serin-proteasa secretada por *Blastocystis* sp. incrementa la permeabilidad intestinal al unirse al extremo N-terminal de los receptores PAR-2 acoplados a proteína G, permitiendo así la apertura de las uniones estrechas y el paso de agua y electrolitos a la luz intestinal, lo que ocasiona diarrea (Chandramathi et al., 2010; Wawrzyniak et al., 2012).

Entre las proteasas secretadas por *Blastocystis* destacan las cistein-proteasas, que también favorecen la invasión y proliferación a través de la catálisis de reacciones metabólicas y degradación del tejido conectivo de la mucosa intestinal. Entre ellas se incluye la legumaina y la capticina B (Sio et al., 2006; Abdel-Hameed and Hassanin, 2011). Mediante estudios *in vitro*, se ha comprobado que las cistein-proteasas degradan las IgA del hospedador, permitiendo al parásito evadir la respuesta inmunitaria, además de comprometer la unión estrecha mediada por Rho/ROCK e inducir la secreción de citoquinas inflamatorias a través de NF- κ B y la apoptosis de las células del hospedador (Mirza et al., 2011) (Figura 10). Además, existen inhibidores de proteasas del hospedador con efectos sobre la homeostasis intestinal, péptidos no ribosómicos y polipéptidos con actividad antibacteriana e inmunomoduladora, que podrían promover la disbiosis de la microbiota intestinal (Puthia et al., 2008).

Figura 10 Algunos mecanismos de patogenicidad de *Blastocystis* sp. en cultivo intestinal *In vitro* (Stensvold et al., 2020)



Blastocystis también segrega hidrolasas (fucosidasa, hexosaminidasa y poligalacturonasa) que degradan los tejidos del hospedador y glicoproteínas del moco intestinal, rompiendo esta barrera protectora contra agentes infecciosos (Parija y Jeremiah, 2013; Bastidas et al., 2019). El sistema inmune por su parte activa la respuesta Th2, lo que permite la liberación de citoquinas (IL-3, IL-4) que provocan hiperplasia de las células caliciformes para incrementar la producción de moco. Los glucoconjugados que se encuentran en la superficie de los protozoos también desempeñan un papel importante en la invasión, adhesión y evasión de la respuesta inmune del hospedador. Los antígenos aislados de *Blastocystis* sp., tienen la capacidad de suprimir a las células mononucleares, provocando efectos perjudiciales para las células epiteliales del intestino, debido a que induce apoptosis y desnaturalización de las proteínas (Ajjampur y Tan, 2016).

La respuesta inmune implicada en la infección por este parásito también incluye la respuesta alérgica mediada por IgE que activa a los linfocitos Th2 los cuales sintetizan citoquinas específicas (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13) que permiten la adhesión del microorganismo a las células epiteliales intestinales, afectando la homeostasis intestinal y permitiendo el reclutamiento de células inflamatorias (El Saftawy et al., 2019).

Se ha descrito que algunos subtipos de *Blastocystis* sp., específicamente el subtipo ST3, pueden inducir una alta proliferación de células cancerígenas *in vitro*. Se cree que esto se debe a un aumento en la producción de TGF- β (factor de crecimiento transformador-beta) y catepsina

B, así como una disminución en la producción de IFN- γ y la expresión de p53. Además, el estrés oxidativo causado por la presencia del parásito en el intestino también puede contribuir a la aparición de neoplasias. Por ello, se ha sugerido que *Blastocystis* sp. puede tener un papel en la aparición de neoplasias gastrointestinales, aunque la dificultad para completar el ciclo vital *in vitro* de los distintos subtipos, especialmente del más común (ST3), impide obtener datos concluyentes en este sentido (Fayer et al., 2014; Kumarasamy et al., 2017; Vdovenko, 2000). Otro de los principales retos para estudiar la patogénesis de *Blastocystis* sp. es la falta de un modelo animal adecuado para determinar si el parásito puede cumplir los postulados de Koch. Los informes de infecciones experimentales con *Blastocystis* sp. han concluido que por ejemplo los ratones de laboratorio no son adecuados como modelos animales para estos fines (Suresh et al., 1995; Moe et al., 1997; Tan, 2008; Tan et al., 2010).

1.9. Manifestaciones clínicas

La blastocistosis también se ha denominado enfermedad de Zierdt-Garavelli en honor a dos de los investigadores que más han estudiado este microorganismo (Garavelli et al., 1991). El curso clínico puede ser asintomático o sintomático, y en este último caso con un cuadro leve y autolimitado de carácter agudo o crónico cuya duración oscila entre 3 y 10 días, aunque puede persistir durante meses e incluso años (Tan et al., 2010).

El síntoma más frecuentemente asociado a la infección por *Blastocystis* es la diarrea, junto con otros como dolor y distensión abdominal, flatulencias, náuseas, vómitos y molestias abdominales inespecíficas (Belleza et al., 2015; Jiménez et al., 2019). Se ha descrito el caso de un paciente fallecido por diarrea refractaria y fulminante siendo *Blastocystis* sp. el único agente identificado (Zierdt y Tan, 1976). En pacientes con inmunosupresión son más frecuentes los cuadros diarreicos crónicos, persistentes o recidivantes, sobre todo los afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y enfermos de cáncer (Rasti et al., 2017; Cristanziano et al., 2019; Asghari et al., 2020; Asghari et al., 2021; Khorshidvand et al., 2021).

Otro grupo de síntomas relacionados con este protozoo son la manifestaciones alérgicas atópicas como prurito palmo-plantar, urticaria, rinitis, asma bronquial, angioedema, rinoconjuntivitis y artralgias (Valsecchi et al., 2004; Gupta y Parsi, 2006). Además se ha descrito un caso de síndrome de Steven Johnson en una niña de 6 años con una infección por *Blastocystis* sp. que cursaba con diarrea y dolor abdominal (Singh et al., 2019). También, se denuncia el caso de un paciente en el que se aisló *Pseudomonas aeruginosa* y *Blastocystis* en una peritonitis

asociada a diálisis peritoneal ambulatoria (Boccardo et al., 1996). Otros síntomas relacionados son más inespecíficos, como anorexia, cefalea, mareo, fiebre, insomnio, laxitud, deshidratación, pérdida de peso, prurito anal, tenesmo, colitis, proctosigmoiditis hemorrágica y ocasionalmente estreñimiento (Lucía et al., 2007; Stensvold et al., 2009c).

La infección por *Blastocystis* sp también se ha asociado con cuadros extraintestinales. Concretamente, se ha descrito un caso de artritis en la que se visualizó microscópicamente *Blastocystis* en el líquido sinovial, relacionando la diseminación hematogena del parásito con el estado de inmunodepresión del paciente por el tratamiento antiinflamatorio administrado (Alamli et al., 2020). Anteriormente, ya se había denunciado un caso de artritis reactiva tras enteritis por *Blastocystis*, postulando los autores que este parásito sea incluido en el diagnóstico diferencial en esta patología (Lee, 1990).

Diversos estudios también se han centrado en el papel potencial de *Blastocystis* sp. en el síndrome del intestino irritable (Giacometti et al., 1999). No obstante, no se ha podido confirmar que sea el agente etiológico primario, sino que probablemente su proliferación obedezca a un desequilibrio de la microbiota. En este sentido, determinados microhábitats intestinales podrían favorecer el crecimiento de este protozoo. En un estudio se evidenció que cuatro pacientes con obstrucción intestinal por un carcinoma presentaban una infección masiva por *Blastocystis* que remitió sin tratamiento tras la resolución quirúrgica de la obstrucción (Horiki et al., 1999). Otro caso clínico se comunicó en un paciente con trasplante alogénico de médula ósea afectado de diarrea profusa por un cuadro agudo de enfermedad intestinal post-trasplante (GVHD), en el que la intensa infección por *Blastocystis* remitió tras tratamiento con metronidazol (Ghosh et al., 1998).

1.10. Diagnóstico

Los métodos más comunes para la detección de *Blastocystis* sp. consisten en el examen microscópico de muestras fecales o el cultivo xénico *in vitro* (Stensvold et al., 2007a; Tan, 2008). Estas técnicas pueden subestimar la presencia del parásito si tenemos en cuenta que algunas formas son difícilmente reconocibles al microscopio (ej. quistes) y en otros casos, su viabilidad para el cultivo puede estar deteriorada por las condiciones ambientales o el tratamiento farmacológico. Además, el cultivo requiere tiempo y puede sesgar el genotipado posterior debido a la diferente capacidad de los aislados para crecer en un medio selectivo (Roberts et al., 2011).

En la actualidad, se han descrito varios enfoques diagnósticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de heces directamente o de muestras obtenidas tras el cultivo (Yoshikawa et al., 2004a; Scicluna et al., 2006; Santín et al., 2011). Diversos estudios han demostrado que estas técnicas moleculares son tan sensibles como el cultivo *in vitro* (Suresh y Smith, 2004; Parkar et al., 2007; Stensvold et al., 2007a), destacando por su alta sensibilidad las técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que amplifican una región del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rRNA) y permiten la subtipificación de los aislados por secuenciación directa de los productos de la qPCR (Poirier et al., 2011; Stensvold et al., 2012a). Actualmente, para el diagnóstico y determinación de subtipos de *Blastocystis* también se puede utilizar la secuenciación Nanopore MinION que permite conseguir secuencias de referencia de longitud completa para cada uno de los nuevos subtipos (Maloney et al., 2019b).

1.10.1. Cultivo in Vitro

Blastocystis es un microorganismo que a lo largo de la historia se ha conseguido cultivar en diversos medios xénicos y axénicos (Roberts et al., 2011; Piekara-Stępińska et al., 2018) (Tabla 2). El cultivo *in vitro* no se utiliza de forma rutinaria como herramienta diagnóstica dada su complejidad y el tiempo que requiere el crecimiento del parásito, aunque puede resultar muy útil en caso de diagnóstico microscópico incierto. En términos comparativos, el cultivo xénico *in vitro* resulta más sensible que la técnica de concentración con formol y acetato de etilo (Leelayoova et al., 2002; Suresh y Smith, 2004; Elghareeb et al., 2015). El medio de cultivo más ampliamente utilizado es el de Jones (medio xénico monofásico con suero de caballo) debido a la simplicidad de su preparación y mínimos requisitos de mantenimiento. Dada su alta sensibilidad, se ha descrito como el medio de aislamiento más sencillo y el método de diagnóstico de referencia para detectar *Blastocystis* sp. (Leelayoova et al., 2002; Termmathurapoj et al., 2004; Gallegos et al., 2013).

Tabla 2 Evolución histórica del diagnóstico de *Blastocystis* sp. mediante cultivo

Autor	Xénico	Axénico	Descripción	Año	Referencias
Barret	x		Primer cultivo xénico en medio suero-salino	1921	(Moghaddam et al., 2005)
Jones	x		Medio monofásico, prueba de referencia	1946	(Barret, 1921)
Robinson	x		Medio complejo para el cultivo de amebas	1968	(Gallegos et al., 2013)
Zierdt/ Williams	x		Medio Boeck-Drbohlav modificado (MBDM) o medio Locke	1974	(Robinson, 1968)
Zierdt/ Swan		x	Medio Locke axenizado con una mezcla de antibióticos	1981	(Zierdt and Williams, 1974)
Dunn		x	Medio Locke sin capa de aceite mineral	1989	(Zierdt and Swan, 1981)
Upcroft		x	Medio mínimo esencial	1989	(Dunn et al., 1989)
Kukoschke/ Müller		x	SDS-PAGE Western blot e inmunodifusión	1991	(Upcroft et al., 1989)
Ho		x	Medio de Dulbecco modificado por Iscove monofásico	1993	(Kukoschke and Muller, 1991)
Lanuza		x	Ficoll-metrizoico y medio fresco con antibióticos	1996	(Ho et al., 1993)

1.10.2. Microscopía

El análisis microscópico de muestras fecales en fresco o previamente concentradas es la técnica más utilizada en los laboratorios de diagnóstico para identificar la presencia de *Blastocystis* sp., cuya visualización resulta más fácil previa tinción tricrómica o con yodo (Tabla 3) (Kellogg and Elder, 1999; Roberts et al., 2011; Nagel et al., 2015). La forma vacuolar de 5-8 μm se considera la morfología estándar, aunque también debe descartarse la presencia de formas multivacuolares más pequeñas para evitar diagnósticos negativos erróneos; además, se recomienda analizar varias muestras de heces ya que la excreción del parásito es irregular (Vennila et al., 1999).

El frotis directo se prepara mezclando una pequeña cantidad de heces con unas gotas de solución salina, siendo la técnica más sencilla. Su sensibilidad es baja debido a la pequeña cantidad de muestra utilizada, por lo que es necesario observar múltiples preparaciones, aunque la visualización del parásito se mejora con la adición de yodo, que colorea el glucógeno y hace

visibles los núcleos (Elghareeb et al., 2015). La identificación también resulta sencilla con la tinción tricrómica modificada, que colorea el cuerpo central de un tono gris o verde y los elementos del citoplasma de color rojo oscuro (Escobedo et al., 2007; Stensvold et al., 2007a; Mohapatra et al., 2018). No obstante, para conseguir un incremento en la sensibilidad se requiere procesar las heces mediante un método de concentración, siendo la técnica de sedimentación con formol y acetato de etilo (FECT) la más ampliamente utilizada para identificar protozoos intestinales, aunque su sensibilidad sigue siendo inferior a la que proporciona el cultivo *in vitro* en medio de Jones (Suresh y Smith, 2004; Elghareeb et al., 2015).

Blastocystis sp. puede adoptar múltiples formas (vacuolar, granular, avacuolar, multivacuolar, ameboide y quiste) por lo que algunas pueden pasar inadvertidas o ser confundidas con artefactos (Parija y Jeremiah, 2013; Del Coco et al., 2017). No obstante, la forma más frecuentemente identificada es la vacuolar, con un diámetro de 6-40 μm y un gran cuerpo central rodeado de hasta seis pequeños núcleos, seguida de las formas quística, granular y finalmente la ameboide, que se encuentra principalmente en medio de cultivo (Elghareeb et al., 2015).

De acuerdo con las guías clínicas médicas, la intensidad de la infección debe notificarse en función del número de parásitos por campo microscópico ($\times 400$) como intensidad alta (≥ 5) o baja (< 5) (Lee, 1990; O'gorman et al., 1993). Un estudio demostró que los pacientes con síndrome de intestino irritable son significativamente más propensos a tener mayor intensidad de parasitación de *Blastocystis* por campo (Giacometti et al., 1999). No obstante, otras investigaciones informaron de una falta de correlación entre el número de *Blastocystis* por campo y la gravedad de los síntomas (Özyurt et al., 2008). Se ha sugerido que la heterogeneidad de las cepas de *Blastocystis* sp. y los factores dependientes del hospedador pueden explicar estas discrepancias (Leder et al., 2005).

Tabla 3 Técnicas de microscopía para la detección de *Blastocystis* sp.

Técnicas	Descripción
Frotis directo	Identifica protozoos móviles
Frotis con tinción de yodo	Identifica los quistes: citoplasma amarillo dorado, material glucógeno marrón y núcleos refráctiles
Técnica de concentración con formol y acetato de etilo	Identifica protozoos intestinales en muestras de heces conservadas
Tinción tricrómica modificada	Cuerpo central grande (aspecto gris/verde y citoplasma de color rojo oscuro)

1.10.3. Serología

En el diagnóstico de las infecciones por *Blastocystis* sp. se han utilizado diversas técnicas serológicas, que proporcionan información sobre la respuesta inmunitaria del paciente ante la presencia del parásito (Salman, 2015). El ensayo inmunoenzimático (ELISA) sigue siendo la técnica serológica más utilizada, cuya sensibilidad y especificidad se ha intentado mejorar en los últimos años (Dogruman-AI et al., 2015). En la tercera conferencia internacional de *Blastocystis*, se presentó un estudio comparativo realizado en Hungría donde se demostraba la correlación de una prueba ELISA con otras técnicas como la microscopía y el cultivo (Kurt et al., 2021). Otras pruebas que proporcionan elevada sensibilidad y especificidad son los ensayos de Western blot, aunque su ejecución requiere más tiempo y son más complejos que las pruebas ELISA (Nagel et al., 2015b). Otras técnicas serológicas que se han utilizado para el diagnóstico de las infecciones por *Blastocystis* incluyen las pruebas de inmunofluorescencia (IFA), ensayo de hemaglutinación indirecta (IHA) y ensayo de aglutinación en látex (LAA), aunque su rendimiento no se ha evaluado tan extensamente como los ensayos ELISA y Western blot (Kaneda et al., 2000).

1.10.4. Diagnóstico molecular

El diagnóstico de *Blastocystis* ha experimentado un avance significativo en los últimos años debido a la introducción de técnicas moleculares y del análisis filogenético. Clark (1997) y Böhm-Gloning et al., (1997) indicaron que la subunidad pequeña del RNA ribosómico (SSU-rRNA) en *Blastocystis* sp. procedentes de humanos es genéticamente diversa, pudiendo su secuencia genética coincidir con la del SSU-rRNA en *Blastocystis* procedentes de un hospedador no humano, lo que cambió la perspectiva de este protozoo al introducirse la posibilidad de que

fuera un agente zoonótico. Desde ese momento se desarrollaron nuevas técnicas de diagnóstico para identificar diferentes dianas de detección.

La primera reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) fue desarrollada por Stensvold et al., (2006) quien describe una especificidad del 100% y sensibilidad superior a la del diagnóstico microscópico para detectar *Blastocystis* sp. en muestras de heces humanas. Con el avance de los estudios moleculares se publicaron las secuencias del gen SSU-rRNA en un número creciente de aislados de *Blastocystis* sp., surgiendo así la necesidad de clasificarlas mediante un procedimiento aceptado por toda la comunidad científica. Por ese motivo, en 2007 se estandarizó la nomenclatura de los subtipos (ST) de *Blastocystis* (Stensvold et al., 2007b), aunque no había una opinión unánime sobre una técnica de subtipado universal a aplicar en todos los laboratorios. Así, se propusieron dos formas de diagnóstico: a) secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR del gen de la subunidad pequeña del rRNA (SSU-rRNA) y b) cebadores específicos de ST (cebadores específicos de sitio de secuencia marcada - STS), que amplificaban específicamente un subtipo u otro (Yoshikawa et al., 2004a; Stensvold, 2013a).

En 2008, Jones et al., propusieron un ensayo de RT-PCR que identifica un amplicón de 152 pb en una región desconocida del genoma de *Blastocystis* (validado frente a ST1, ST3 y ST4). Posteriormente, se describieron ensayos de RT-PCR "pan-*Blastocystis*" que permiten el subtipado (ST1-ST9) mediante el análisis de la curva de fusión; sin embargo, el tamaño del producto de PCR (320 a 342 pb) pueden reducir la sensibilidad de la técnica, problema que se une a la especificidad incompleta (95%) de la prueba (Poirier et al., 2011).

La posterior introducción de la tecnología TaqMan, que utiliza una sonda de hidrólisis basada en el gen SSU-rRNA (sonda específica y control de proceso interno para identificar casos de inhibición de la PCR), proporcionó un 100% de especificidad y capacidad para detectar nueve subtipos (Stensvold et al., 2012a). Este método no se ha utilizado en estudios a gran escala; sin embargo, podría ser útil en la práctica clínica porque puede identificar si los rangos de los valores Ct (ciclo umbral) están asociados con el ST y si el desarrollo de síntomas en los pacientes está asociado con la cuantificación del ADN específico de *Blastocystis*, permitiendo a los clínicos elegir un mejor enfoque de tratamiento con el resultado del informe (Stensvold et al., 2012a).

Los investigadores han propuesto diferentes regiones del gen SSU-rRNA como dianas de PCR y secuenciación (Stensvold y Clark, 2016). Uno de los métodos es similar a la técnica denominada "barcoding" o código de barras genético, que se utiliza tradicionalmente para la

identificación de especies amplificando y secuenciando un gen mitocondrial. En el caso de *Blastocystis*, la propuesta de “código de barras” se basa en la secuenciación de un segmento que abarca los ~ 600 pb del extremo 5', del gen de SSU-rRNA, que por su variabilidad proporciona información que puede sustituir a la obtenida del gen completo. Toda la información necesaria para aplicar este procedimiento está disponibles en GenBank®, *Blastocystis* Subtype (18S), y en Sequence Typing (MLST) Database (<http://pubmlst.org/blastocystis>) (Stensvold, 2013a).

Una adaptación ampliamente utilizada en la actualidad es la propuesta por Santín et al., (2011). Partiendo de regiones conservadas de distintos subtipos de *Blastocystis* depositadas en GenBank®, estos investigadores desarrollaron un conjunto de cebadores específicos basados en el alineamiento múltiple de secuencias del gen SSU-rRNA. Así, los cebadores forward Blast 505-532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') y reverse Blast 998-1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3') amplifican un fragmento de aproximadamente ~ 500 pb (479) mediante un protocolo de PCR más sensible que el efectuado con otros cebadores, ya que contiene la región variable que permite la subtipificación y posibilita el análisis filogenético de este parásito.

Paralelamente, se desarrolló un método de cebadores PCR de sitio marcado por secuencia (Sequence-Tagged-Site PCR primers o STS) basado en el uso de cebadores específicos, que no precisa secuenciación y permite detectar directamente infecciones mixtas por distintos subtipos (Yoshikawa et al., 2004a; Stensvold, 2013b). No obstante, la técnica únicamente detecta determinados subtipos (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 y ST7) y en algunos se ha señalado una baja sensibilidad (ST4) (Stensvold, 2013b).

En la actualidad y debido a su elevada prevalencia en población humana, *Blastocystis* sp. se ha incluido en paneles diagnósticos comerciales de patógenos gastrointestinales como NanoChip (Savyon Diagnostics, Israel), EasyScreen™ Enteric Parasite Detection Kit (Genetic 305 Signatures, Sydney, Australia) y Feconomics (Salubris Inc, Boston, USA) lo que supone una mejora en la práctica clínica diaria, especialmente a la hora de decidir el manejo del paciente (Stensvold and Clark, 2016). En la Tabla 4 se resumen las diversas técnicas moleculares que se han utilizado en la detección de este protozoo.

Tabla 4 Técnicas de diagnóstico molecular de *Blastocystis* sp.

Técnica	Diana	Año	Referencias
Primera PCR	~ 300 pb (extremo 3' del fragmento del gen SSU-rRNA)	2006	(Stensvold et al., 2006)
Ensayo RT-PCR	152-bp (región desconocida del genoma de <i>Blastocystis</i>)	2008	(Jones et al., 2008)
Ensayo RT-PCR basado en SYBR-green	320 a 342 pb (fragmento del gen SSU-rRNA) Detecta RNA específico de <i>Blastocystis</i> mediante análisis de la curva de fusión	2011	(Poirier et al., 2011)
RT-PCR con sondas TaqMan	Utilizar una sonda de hidrólisis basada en el fragmento del gen SSU-rRNA y Ct (ciclo umbral)	2012	(Stensvold et al., 2012a)
Código de barras (Barcoding)	~600 pb-5' (fragmento del gen SSU-rRNA) Cebador directo de especificidad eucariota (RD5) y cebador inverso de especificidad de género (BhRDr)	2006	(Scicluna et al., 2006)
Protocolo de PCR y secuenciación	~ 500 pb (fragmento del gen SSU-rRNA) Cebador directo Blast 505-532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') Cebador inverso Blast 998-1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3')	2011	(Santín et al., 2011)
Cebadores de secuencia específica (STS)	~ 300-700 pb Utiliza cebadores de diagnóstico específicos (ST1 a ST7)	2004	(Yoshikawa et al., 2004a)

1.10.5. Otras técnicas moleculares

1.10.5.1. Tipificación de secuencias Multilocus

Multilocus sequence typing ó MLST ofrece otra posibilidad de estudio de la variabilidad genética en *Blastocystis* sp. y se basa en la secuenciación de varios loci (Enright y Spratt, 1999; Urwin y Maiden, 2003). Esta técnica ha permitido investigar la diversidad de subtipos de *Blastocystis* sp. combinando la secuenciación de alto rendimiento y la bioinformática con técnicas específicas de genética de poblaciones (Stensvold et al., 2012b). Se establece así un sistema de tipificación reproducible, portátil y escalable que aporta información sobre la evolución de especies de patógenos (Urwin y Maiden, 2003). Un estudio mediante MLST encontró variabilidad genética intra-subtipo dentro de ST3 y ST4. Los resultados sugieren que ST4, por su escasa variación de secuencias y por ser mucho más común en poblaciones europeas que en otras, ha colonizado seres humanos más recientemente que ST3 (Domínguez-Márquez et al., 2009; Stensvold et al., 2011a).

1.10.5.2. Metagenómica

La metagenómica es una técnica no dirigida, amplia y sensible que en su origen se limitaba a estudiar las comunidades bacterianas en varios tipos de muestras y posteriormente se ha utilizado para investigar el genoma de comunidades de otros microorganismos en un entorno determinado, incluyendo virus y parásitos (Andersen et al., 2015; Wylezich et al., 2019). De hecho, son numerosos los estudios de la microbiota, constituida por bacterias, virus, hongos, arqueas y protozoos, cuyo papel en el ecosistema intestinal humano empieza a reconocerse y a comprenderse más profundamente (Kim et al., 2022). Dado que *Blastocystis* sp. es un protozoo intestinal con una patogenicidad controvertida, se han realizado algunos estudios para explorar su papel en el intestino humano. Andersen et al., (2015) estudiaron los datos obtenidos por análisis metagenómico de 316 muestras de ADN fecal humano mediante la búsqueda de genes específicos de subtipos de *Blastocystis* sp. y observaron que la presencia de este protozoo es mucho menos frecuente en aquéllas con predominio de *Bacteroides* sp. que en las que predominaban *Ruminococcus* sp. y *Prevotella* sp., siendo estas últimas indicativas de un sistema microbiano intestinal rico.

Beghini et al., (2017) reconstruyeron el genoma completo de *Blastocystis* sp. a partir de metagenomas, proporcionando nueva información sobre la diversidad en el género, los rasgos funcionales y las relaciones filogenéticas dentro de los subtipos. Estos autores concluyen que *Blastocystis* sp. es un componente de la microbiota intestinal saludable, al no encontrar asociación positiva con la enfermedad gastrointestinal y a su menor presencia en los individuos afectados por disbiosis asociada con cáncer colorrectal y enfermedad de Crohn. Por el contrario, Yason et al., (2019) encontraron que el ST7 de *Blastocystis* sp. puede desencadenar un desequilibrio en las poblaciones de la microbiota, lo que podría relacionarse con su efecto patógeno.

Un análisis paralelo acerca del efecto de *Blastocystis* sp. y *Entamoeba* sobre la microbiota realizado por Even et al., (2021) permitió concluir que *Blastocystis* estaba asociado con una mayor riqueza y uniformidad de la microbiota intestinal. Por el contrario, *Entamoeba* se asoció sólo con mayor riqueza, lo que sugiere que estos dos protozoos interactúan con las bacterias intestinales de diferente manera (Even et al., 2021). Recientemente, se analizó una cohorte coreana con 39 muestras fecales, mostrando resultados similares al resto de estudios anteriores: el grupo *Blastocystis*-positivo presentó mayor riqueza y diversidad de la microbiota, indicando que este parásito es un biomarcador potencial de una microbiota intestinal saludable

o incluso un promotor de la eubiosis del microbioma intestinal (Kim et al., 2022). Queda mucho camino por recorrer en la comprensión de la microbiota intestinal. Aun así, con la ayuda de la metagenómica, su investigación futura puede conducir al desarrollo de alternativas terapéuticas innovadoras, como la suplementación con probióticos.

1.10.5.3. Metabarcoding

El metabarcoding se basa en la secuenciación de nueva generación complementada con PCR en tiempo real y es otra herramienta de alta sensibilidad que se ha utilizado para detectar y diferenciar *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2021). Es una técnica rentable si se compara con otros métodos como la metagenómica, aunque sólo proporciona información sobre unos 300 - 400 pb del gen SSU-rRNA. Las consultas BLAST deben interpretarse con sumo cuidado y, a diferencia de la metagenómica, esta técnica no proporciona información sobre otros genes, pese a requerir equipamientos similares (Stensvold et al., 2021).

Scicluna et al., (2006) desarrollaron un método para subtipar *Blastocystis* sp. utilizando un enfoque equivalente al código de barras de ADN en animales, basado en la amplificación de un segmento de 600 pb del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. seguido de su secuenciación (Clark et al., 2013). Algunos años después, Stensvold et al., (2021) detectaron con esta tecnología varios parásitos unicelulares intestinales en las heces de humanos y cerdos y obtuvieron información sobre subtipos de *Blastocystis* sp. y la diversidad intra-subtipo. La técnica también ha sido utilizada por Chihi et al., (2022) para la detectar y diferenciar protistas intestinales humanos y concluyen que proporciona valiosos datos sobre la diversidad intragenérica/especies, ayudando a establecer relaciones taxonómicas entre microorganismos.

1.10.5.4. Secuenciación mediante nanoporos

Esta tecnología, comercializada bajo el nombre “Oxford Nanopore MinION”, se ha utilizado para generar secuencias completas de gran precisión (> 1800 pb) del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. a partir de aislados obtenidos de cultivo y heces (Maloney y Santin, 2021). Para ello se utiliza un dispositivo de nanoporos que permite el paso de una sola hebra de ácido nucléico para su secuenciación con total precisión. La secuenciación se basa en las señales eléctricas de las respectivas bases A, T, G y C, recopilando la información de la secuencia de forma continua mediante un software *ad hoc* (Maloney et al., 2020). Se generan así lecturas largas (~ 882 kb), que facilitan el ensamblaje de los genomas procarióticos y eucarióticos. Esta

técnica produce por tanto secuencias completas que permiten incluso identificar muestras con subtipos mixtos y de baja abundancia. Hasta la fecha, esta herramienta ha generado referencias de longitud completa para 17 subtipos. En la actualidad, se recomienda disponer de una secuencia casi completa para poder describir un nuevo subtipo. La técnica contribuye además a obtener un análisis filogenético más sólido (Maloney et al., 2020, 2023; Maloney y Santin, 2021). Utilizando esta tecnología, Higuera et al., (2021) han descrito recientemente un nuevo subtipo (ST32) en una cabra y una vaca en Colombia. Los autores evidencian además en su estudio la gran diversidad de subtipos en animales domésticos, incluyendo algunos identificados en humanos, mostrando una vez más su transmisión zoonótica potencial.

1.11. Actualización de los subtipos de *Blastocystis* sp.

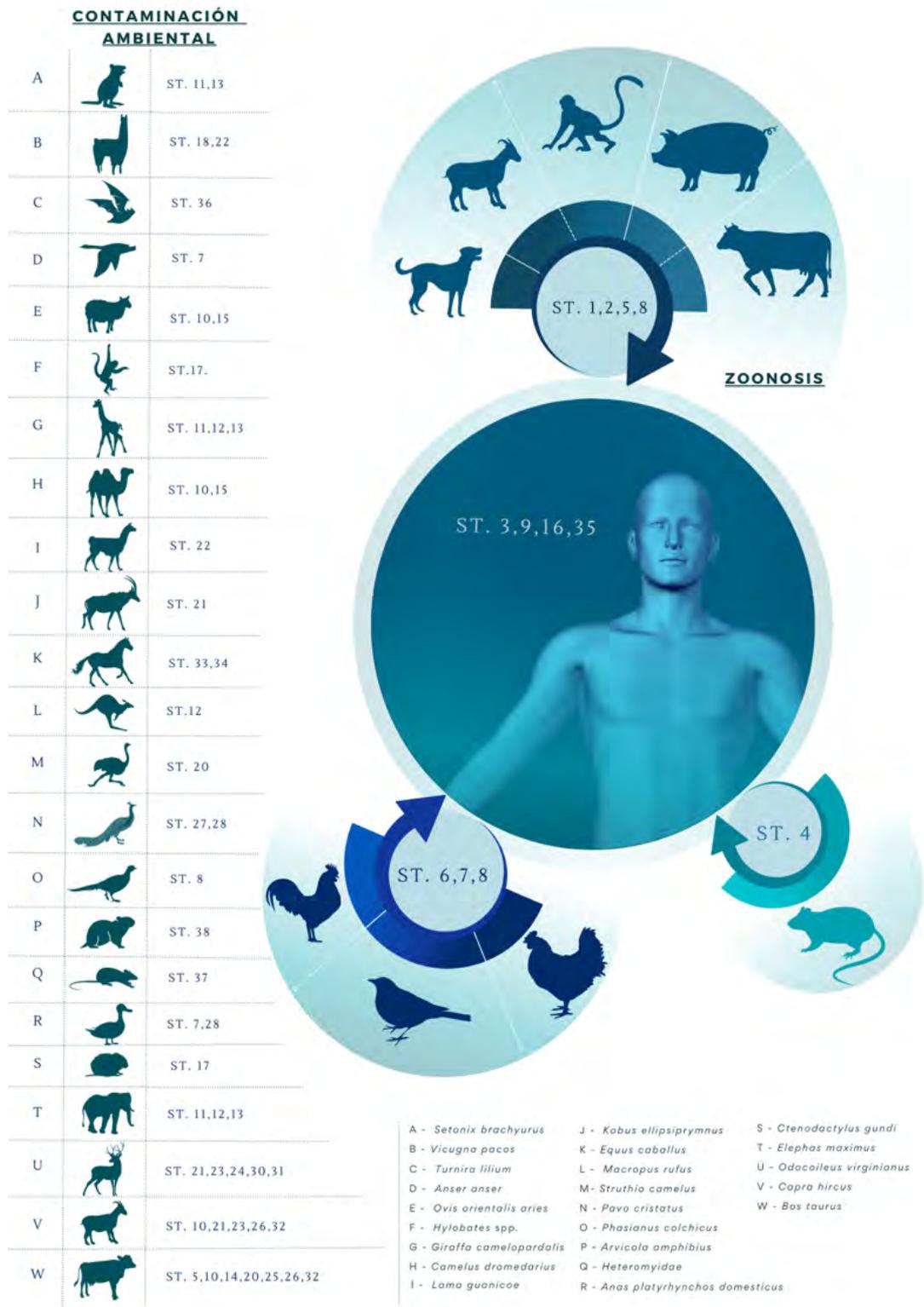
Los nuevos métodos de diagnóstico han permitido un avance significativo en la identificación de los subtipos de *Blastocystis*, lo que permitirá a corto plazo tener una visión precisa de la distribución mundial de este parásito en la especie humana, en animales y en el medio ambiente. La estandarización de la nomenclatura para identificar y denominar los subtipos de *Blastocystis* sp. fue propuesta por Stensvold et al. (2007b) en base a la secuenciación del gen SSU-rRNA. Los autores describen nueve subtipos (ST1-ST9) en muestras aisladas de aves y mamíferos y proponer sustituir el término "*Blastocystis hominis*" por *Blastocystis* sp. El subtipo 10 fue descrito dos años después en hospedadores no humanos (*Lemur catta*, *Bos taurus*, *Ovis aries* y *Capreolus*) en Dinamarca (Stensvold et al., 2009a) y un poco más tarde se describen también en animales siete nuevos subtipos (ST11-ST17) (Parkar et al., 2010; Fayer et al., 2012; Alfellani et al., 2013c).

La diversidad de subtipos de *Blastocystis* sp. identificados en animales es muy amplia. En el ganado vacuno (*Bos taurus*) se identificaron los subtipos ST1, ST3, ST5, ST10, ST14 (Stensvold et al., 2009a; Fayer et al., 2012). Además, se describen ST11, ST12 y ST13 en elefantes, jirafas (*Giraffa camelopardalis*, jirafa del Kilimanjaro) y en el marsupial *Setonix brachyurus* (Parkar et al., 2010). Asimismo, ST15 y ST17 se evidenciaron en un camello (*Camelus dromedarius*), oveja (*Ovis aries*), un ejemplar de gundi (*Ctenodactylus gundi*) y un gibbon (*Hylobates* spp.) (Alfellani et al., 2013b) y ST16 en un canguro (*Macropus rufus*). Posteriormente, se han notificado otros cinco nuevos subtipos en diferentes animales, como ST18 en la alpaca (*Vicugna pacos*), ST19 en el macaco (*Macaca mulatta*), ST20 en el avestruz (*Struthio camelus*), ST21 en el antílope acuático (*Kobus ellipsiprymnus*) y ST22 en el guanaco (*Lama guanicoe*) (Zhao et al., 2017), aunque tres de estas variantes (ST18 al ST20) no fueron finalmente validadas como

nuevo subtipos al no cumplir los criterios de propuestos por Stensvold et al., (2020), siendo consideradas quimeras moleculares (Stensvold y Clark, 2020).

En ganado vacuno (*Bos taurus*) se han identificado los subtipos ST21 a ST26 (Maloney et al., 2019a, 2019b). En 2020, se identificaron tres nuevos subtipos (ST27, ST28 y ST29) en el pavo real (*Pavo cristatus*), en la cerceta carretona (*Spatula querquedula*) y en la gallina doméstica (*Gallus gallus domesticus*), respectivamente (Maloney et al., 2020a, 2020b). Más recientemente, se han validado como nuevos subtipos las variantes ST30 a ST34 a partir de muestras de vaca (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*), caballo (*Equus caballus*) y humanos (Baek et al., 2022; Higuera et al., 2021; Maloney et al., 2021b). La lista se completa por el momento con los denunciados el presente año, ST35 en humanos, ST36 en el murciélago americano *Sturnira lilium*, ST37 en el ratones canguro de la familia Heteromyidae, y ST38 en la rata de agua *Arvicola amphibius* (Maloney et al., 2023). Se describen los subtipos y hospedadores en el figura 11.

Figura 11 Subtipos de *Blastocystis* sp. identificados actualmente y hospedadores (imagen propia)



Las anteriores consideraciones revelan las grandes aportaciones que las herramientas moleculares han tenido en el conocimiento de este protozoo, proporcionando una visión más amplia de su biología, diversidad genética, metabolismo e interacciones con la microbiota intestinal, lo que puede llevar a desvelar la controvertida cuestión de la patogenicidad de *Blastocystis*. No obstante, los investigadores y especialistas sanitarios deben mantener las técnicas básicas de diagnóstico, como la microscopía y el cultivo, por su fiabilidad, rapidez de ejecución, menor coste y acceso universal, que es el objetivo de una herramienta de diagnóstico clínico y epidemiológico.

1.12. Tratamiento

La necesidad de tratamiento de las infecciones por *Blastocystis* sigue siendo controvertida. La ausencia de una prueba indiscutible sobre la patogenicidad del microorganismo y la falta de diagnóstico etiológico en muchos pacientes con síntomas son motivo de preocupación para los médicos. Por todo esto, no existe un consenso sobre la necesidad terapéutica, salvo en los casos de los portadores asintomáticos en el que se coincide que el tratamiento no es necesario (Sekar y Shanthi, 2013).

Se han evidenciado varias razones para la limitación terapéutica: la curación biológica espontánea de la enfermedad, la aparición de efectos secundarios debido al tratamiento, el carácter autolimitado de la blastocistosis y la persistencia del parásito tras la administración de antibiótico. De hecho, hay estudios donde no se observa diferencia significativa entre la ratio de erradicación de *Blastocystis* con metronidazol y la desaparición espontánea del parásito en muestras fecales (Roberts et al., 2014a). A pesar de ello, hay autores que recomiendan el tratamiento en pacientes sintomáticos, independientemente de su estado inmunológico, aunque la infección pueda remitir de manera espontánea (Nigro et al., 2003).

García-Martos y Benjumeda, (1992) establecieron como criterios terapéuticos en caso de blastocistosis la persistencia o recurrencia de síntomas, la aparición de eosinofilia y la observación de una carga parasitaria elevada de *Blastocystis* sp. La información sobre el tratamiento de la infección por *Blastocystis* sp. procede en gran medida de estudios de casos y controles, en los que se evalúa tanto los hallazgos clínicos como el efecto de fármacos como el metronidazol, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), nitazoxanida y paromomicina, aunque

los métodos de diagnóstico utilizados en estos estudios no son uniformes (Moghaddam et al., 2005).

En un ensayo clínico realizado por Nigro et al., (2003) se observó la remisión de los síntomas en casi el 90% de los sujetos 1 mes después de finalizar el tratamiento con metronidazol (1,5 gr/día durante 10 días consecutivos) en comparación con el 14% de personas del grupo placebo. Sin embargo, en al momento del seguimiento a 6 meses se encontró aumento de las recaídas parasitarias en los pacientes tratados con metronidazol, tanto sintomático como asintomático, aunque se desconoce si la recurrencia de la infección estuvo relacionada con el agravamiento o con la reinfección.

Otro ensayo clínico evaluó la eficacia de la nitazoxanida para el tratamiento de la diarrea y enteritis asociadas con *Blastocystis* sp., en dosis variables según la edad de los pacientes (Rossignol et al., 2005). Casi el 90% de los pacientes tratados mostraron resolución de los síntomas y resultaron negativos en el estudio coprológico al cuarto día de finalización de la terapia, mientras que la remisión de síntomas se observó en el 38% de pacientes que recibieron un placebo y sólo el 12% de este grupo resultaron negativos ($p < 0,0001$).

A pesar de estos ensayos, el tratamiento en blastocistosis, se sigue administrando de forma empírica, sin estudios de sensibilidad previa. El fármaco de primera línea es el metronidazol, a dosis entre 250 a 750 mg cada ocho horas por vía oral durante siete días. En niños, se suele administrar este fármaco a dosis de 50mg/kg de peso cada ocho horas (Ibrahim et al., 2021). Generalmente la resolución de los síntomas y la eliminación de los parásitos en heces se consigue tras catorce días de tratamiento; sin embargo se han observado casos donde la eliminación del microorganismo tarda entre tres y seis meses.

En varios estudios se han descrito recidivas, así como fallos terapéuticos y de intolerancia a dosis elevadas de metronidazol, lo que ha motivado el uso de otros tratamientos (Roberts et al., 2014b). Zierdt (1991b) concluyó en uno de sus ensayos que la dosis de metronidazol debe ser incrementada en casos de blastocistosis crónica, junto con la conveniencia de añadir tetraciclinas en casos de blastocistosis refractaria, para eliminar el soporte bacteriano esencial para la supervivencia *Blastocystis* sp.

En un estudio que se llevó a cabo con pacientes de varias procedencias y diferentes localizaciones geográficas se encontró un variable grado de resistencia al metronidazol; lo que

suigere que la dieta, la respuesta inmunitaria del hospedador o la influencia del medio ambiente, pueden ser factores que afectan a la sensibilidad al metronidazol de *Blastocystis* (Rajamanikam et al., 2019). Además se han propuesto otras líneas de tratamiento como: paromomicina con dosis de 25 mg/kg/vía oral cada ocho horas durante cinco a diez días, tinidazol con dosis de 2 gr/día/vía oral durante cuatro semanas. Otros ensayos encontraron otras alternativas terapéuticas para blastocistosis: iodoquinolona, furazolidona rifaximina y cotrimoxazol (Farthing, 2006; Van Hellemond et al., 2013).

1.13. Estado actual de la investigación sobre *Blastocystis* sp. en humanos en España

En España se han llevado a cabo varios estudios sobre la infección por *Blastocystis* sp. en humanos, la mayoría de los cuales se han centrado en determinar la prevalencia en diversos grupos de población y más recientemente, en la investigación de los subtipos circulantes. Los valores de prevalencia registrados son variables dependiendo de la localización geográfica y se han visto influidos por el uso de herramientas cada vez más sensibles. Las primeras publicaciones se llevan a cabo en población infantil en Salamanca, donde se detecta mediante microscopía un prevalencia de 10,3% en guarderías, 19,4% en niños de escuela primaria y 3,25% en niños hospitalizados (Martín-Sánchez et al., 1992). Otro estudio en Zaragoza, reportó las características clínicas de 10 niños con infecciones intestinales causadas por *Blastocystis*. Nueve de cada diez pacientes presentaron dolor abdominal y en tres casos se realizó una apendicectomía debido a un malestar pseudoapendicular. Todos los niños se recuperaron satisfactoriamente, independientemente de si recibieron tratamiento con metronidazol o no (Fleta Zaragozano et al., 1993).

Unos años más tarde en Valencia, se publican los resultados del estudio llevado a cabo por Carbajal et al., (1997), donde se informa de una tasa de prevalencia del 16,5% sobre una muestra de más de 2.000 pacientes, con un tasa de portadores asintomáticos del 3,3% y sin observarse diferencias en la prevalencia entre pacientes VIH+ (18,6%) y VIH- (17%). Una muestra más numerosa se utilizó en el estudio posterior de González-Moreno et al., (2011) en Cataluña, donde se analizan 13913 muestras de 8313 pacientes con trastornos digestivos entre 1999 y 2005 y se identifica como parásito predominante a *Blastocystis* (7%), seguido de *Giardia duodenalis* (3,9%), *Dientamoeba fragilis* (1,6%), *Entamoeba coli* (0,7%) y *Cryptosporidium* sp. (0,7%).

Más recientemente, Ocaña-Losada et al., (2018) mediante detección microscópica reporta la infección por *Blastocystis* sp. en el 18% de pacientes que habían acudido a la Unidad de Medicina Tropical del Hospital de Almería entre 2004 y 2016, mientras que Paulos et al., (2018) ya señalan una cifra más alta (35,2%) cuando utilizan una técnica de PCR para realizar el diagnóstico en población humana en Álava. *Blastocystis* sp. fue el segundo parásito más frecuentemente en población escolar en el municipio de Leganés (13%), frente al 17,4% de individuos infectados por *Giardia duodenalis* y 0,9% por *Cryptosporidium* donde se realizó el diagnóstico con técnica de PCR (Muadica et al., 2020). En Madrid, se estudiaron parásitos intestinales en niños asintomáticos entre 4 y 14 años, y mediante el uso de la técnica de PCR se identificó que la prevalencia de *G. duodenalis* fue del 18%, *Blastocystis* sp. del 13% y *Cryptosporidium* spp. del 1% (Ruiz Chércoles et al., 2020). Unas cifras ligeramente distintas han sido señaladas en una publicación del presente año por Hernández-Castro et al. (2023) utilizando técnicas de PCR para analizar muestras fecales de niños que acuden a guarderías públicas del municipio próximo de Majadahonda, donde identifican *G. duodenalis* (52%), *Blastocystis* sp. (5,6%), *Cryptosporidium* spp. (4%) y *Entamoeba dispar* (0,8%).

Los estudios sobre identificación de subtipos de *Blastocystis* sp. no son numerosos en nuestro país, en la tabla 5 se recogen los hallazgos de algunos trabajos realizados en distintas zonas geográficas. Cabe destacar que en la mayoría de estas publicaciones se identifican los cuatro subtipos (ST1-ST4), aunque con distinta frecuencia de aparición, siendo relevante el predominio del ST2 en todos los estudios con excepción del estudio realizados en Valencia donde hubo una mayoría abrumadora de los pacientes infectados por la variante ST4 (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023)

Tabla 5 Frecuencia de subtipos (%) de *Blastocystis* sp. identificados en infecciones humanas en diversos estudios en España

Subtipos	Valencia ^a	Álava ^b	Leganés (Madrid) ^c	Majadahonda (Madrid) ^d
	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
ST1	1 (1,9)	7 (13,2)	37 (22,8)	1 (3,8)
ST2	2 (3,9)	33 (62,3)	59 (36,4)	12 (46,2)
ST3		9 (17)	35 (21,6)	4 (15,4)
ST4	48 (94,2)	4 (7,5)	30 (18,5)	9 (34,6)
ST8	-	-	1 (0,7)	-
	51 (100)	53 (100)	162 (100)	26 (100)

^a (Domínguez-Márquez et al., 2009); ^b Paulos et al., (2018); ^c Muadica et al., (2020); ^d (Hernández-Castro et al., 2023)

2. JUSTIFICACIÓN

La blastocistosis humana es una de las protozoosis intestinales más frecuentes en humanos y animales a nivel mundial. *Blastocystis* sp. es el protista entérico causante de esta enfermedad, cuya presencia se asocia a cuadros gastrointestinales en más de mil millones de personas, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo.

La blastocistosis presenta además implicaciones en el área de salud pública derivadas del carácter zoonótico potencial de *Blastocystis* sp., ya que según determinadas investigaciones este microorganismo puede transmitirse al hombre a partir de diversas especies animales. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso a comienzos del presente milenio la estrategia “One Health”, basada en un esfuerzo de colaboración interdisciplinario que busca la salud óptima de las personas, los animales y el medio ambiente para llegar a un equilibrio a todos los niveles.

Diversas causas justifican la elevada prevalencia de *Blastocystis* sp. su transmisión tiene lugar mediante la vía fecal-oral y en los países en desarrollo está relacionada con factores socioeconómicos que conducen a un saneamiento deficiente y a un aumento de las fuentes potenciales de infección, incluida la transmisión persona a persona, zoonótica y a través de agua contaminada.

Blastocystis sp. se descubrió hace más de un siglo; sin embargo, su patogenicidad continúa siendo objeto de debate. Varios estudios apoyan el potencial patógeno de este parásito en humanos al informar de síntomas gastrointestinales, así como síntomas cutáneos, principalmente urticaria, en ausencia de otra causa de enfermedad identificada en los pacientes. Por el contrario, otros estudios no han aportado pruebas concluyentes del papel patógeno de *Blastocystis* sp. y consideran que es un microorganismo común de la microbiota intestinal de individuos sanos.

Uno de los aspectos que ha generado mayor interés entre la comunidad científica en la última década son el número creciente de estudios que han explorado la diversidad genética de *Blastocystis* sp. Hasta la fecha se han descrito un total de 38 subtipos diferentes en humanos y animales basados en variaciones en el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (SSU-rRNA). Sin embargo, la posible correlación entre los diferentes subtipos y su potencial patogénico sigue siendo muy debatida.

Las infecciones humanas por *Blastocystis* sp. son consecuencia de múltiples factores de riesgo entre los que se incluyen las condiciones higiénicas-sanitarias deficientes, especialmente la falta de potabilidad del agua y el contacto con animales. Otros factores son un bajo nivel socioeconómico y educativo. Asimismo, las infecciones por *Blastocystis* sp. se han relacionado con la edad, siendo los niños el colectivo más afectado, así como un estado nutricional deficiente y algunas afecciones clínicas como anemia y síndrome del intestino irritable.

La infección por *Blastocystis* sp. en humanos está descrita prácticamente a nivel mundial. En España, los estudios sobre prevalencia, factores de riesgo y biología molecular son limitados y se centran mayoritariamente en grupos específicos de población. Se han realizado investigaciones en escolares asintomáticos y sintomáticos utilizando técnicas microscópicas y/o basadas en PCR para la identificación del parásito en la Comunidad autónoma de Madrid. Además, se han realizado algunos estudios en humanos en las Comunidades autónomas de Cataluña, Valencia y Castilla y León. Sin embargo, la información continúa siendo muy limitada y los estudios de biología molecular para conocer los subtipos de *Blastocystis* sp. circulantes en humanos en España son escasos.

A pesar de la amplia distribución de este parásito en población humana, todavía persisten dudas sobre su participación en la patología clínica del paciente, por lo que se mantiene el debate sobre si *Blastocystis* sp. es un comensal intestinal o es un patógeno. Existe igualmente un intenso debate sobre la influencia que pueden tener diversos factores socio-demográficos (edad, sexo, nivel socio-económico de la población, origen geográfico de los pacientes, convivencia con animales, etc.) en la infección por este microorganismo en diferentes regiones del mundo. Finalmente, tampoco está claro el posible efecto que sobre su presencia pueden tener factores individuales como la co-morbilidad con otros procesos o los tratamientos médicos previos a los que los pacientes están sometidos.

En el área de estudio objeto del presente trabajo (Área Sanitaria 3 de la provincia de Zaragoza), no hay estudios previos que investiguen estos aspectos de la infección por *Blastocystis* sp. y se desconoce la variabilidad genética de los aislados circulantes en población humana que permitan valorar, entre otras cosas, el origen de las infecciones. Todo ello nos ha llevado a plantear un estudio de casos y controles para analizar el efecto de diversas variables sobre la prevalencia de *Blastocystis* sp. en una amplia muestra de población, junto con estudio molecular de las muestras positivas para determinar los subtipos del parásito más prevalentes.

3. HIPÓTESIS

Las hipótesis que nos planteamos contrastar en este estudio son las siguientes:

- *Blastocystis* sp. se encuentra entre los parásitos más frecuentemente identificados en población humana en la zona de estudio.
- *Blastocystis* sp. es un agente patógeno capaz de ocasionar un cuadro clínico por sí mismo o en asociación con otros agentes.
- Determinados factores demográficos y socio-culturales están asociados a la infección por *Blastocystis* sp.
- Algunos factores individuales como la co-morbilidad con otros procesos, las co-infecciones con otros agentes y los tratamientos médicos a los que se someten los pacientes se asocian al riesgo de infección por *Blastocystis* sp.
- Teniendo en cuenta la amplia distribución de este microorganismo en todo el mundo es muy probable una elevada variabilidad genética.
- El estudio molecular de los aislados de *Blastocystis* sp. identificados puede arrojar información sobre su origen al compararlo con aislados de origen humano y animal de otras zonas geográficas.

4. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general profundizar en el conocimiento de la epidemiología clínica y molecular de la infección por *Blastocystis* sp., mediante un estudio de casos y controles en pacientes con síntomas gastrointestinales pertenecientes al área sanitaria 3 de Zaragoza, utilizando para ello técnicas microscópicas y moleculares.

Los objetivos específicos que nos hemos fijado son:

1. Determinar la prevalencia de *Blastocystis* sp. y sus posibles variaciones en función de diversos factores de tipo individual, socio-demográfico y clínico de los pacientes infectados, así como co-infecciones con bacterias patógenas u otros parásitos.
2. Identificar los subtipos de *Blastocystis* sp. en la población objeto de estudio y la posible coexistencia de diversos subtipos en un mismo individuo.
3. Investigar la filogenia y diversidad genética de los aislados de *Blastocystis* sp. identificados en los pacientes infectados, así como su grado de homología con aislados de diverso origen (humano, animal) y procedencia depositados en GenBank®.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Materiales y muestras

5.1.1. Declaración de aprobación de ética

El presente estudio se realizó siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) (Anexo 1) y se obtuvo el pertinente permiso del mismo (ref 18/081) antes de emprender esta investigación, que cumple con las normativas legales vigentes nacionales e internacionales. Se obtuvo un consentimiento informado firmado de cada paciente participante. Se siguieron todos los procedimientos obligatorios en lo referente a la protección de la salud y la seguridad. Además, se obtuvo la autorización del jefe de Servicio del Servicio de Microbiología y Parasitología, así como de la dirección médica y de docencia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza (Anexo 2).

5.1.2. Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Clínico Universitario (HCU) Lozano Blesa, que pertenece al Sector Sanitario Zaragoza III en España. Este sector tiene una extensión superior a 6.000 km² y lo componen 116 municipios de nueve comarcas diferentes, con una población total de 306.000 habitantes, de los cuales 48.000 son inmigrantes. El HCU es un hospital público de nivel 3, que atiende a una población mixta urbana y rural, ya que presta servicio a la zona noroccidental de la provincia de Zaragoza y el oeste de la ciudad de Zaragoza e incluye las zonas de Salud de Alagón, Borja, Cariñena, Casetas, Ejea de los Caballeros, Épila, Gallur, Herrera de los Navarros, La Almunia, María de Huerva, Sádaba, Sos del Rey Católico, Tarazona, Tauste y Utebo. En el municipio de Zaragoza da servicio las zonas de Bombarda, Delicias Norte, Delicias Sur, Miralbueno-Garrapinillos, Oliver, Univérsitas y Valdefierro (Amorín, 2007) (Anexo 3). Tiene un total de 807 camas, con 3.753 empleados como personal sanitario. Su cartera de servicios consta de 80 áreas entre especialidades médicas y servicios centrales (Amorín, 2007).

Entre los centros médicos del Sector Sanitario 3 se incluyen:

- Servicios de Atención primaria (Centros de Salud) de Alagón, Bombarda, Borja, Cariñena, Casetas, Delicias Norte, Delicias Sur, Ejea de los Caballeros, Épila, Gallur, Herrera de los Navarros, La Almunia de Doña Godina, María de Huerva, Miralbueno, Oliver, Sádaba, Sos del Rey Católico, Tarazona, Tauste, Univérsitas, Utebo y Valdefierro.

- Centros de atención especializada (Centros de Especialidades Médicas): C.E.M. Inocencio Jiménez, C.E.M. Ejea y C.E.M. Tarazona.
- Centros de Atención especializada (Hospitales): Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" y Centro de Rehabilitación Psicosocial "Nuestra Señora del Pilar".
- Salud mental: Unidad de Salud Mental Cinco Villas (Ejea), Unidad de Salud Mental-Consultas Externas Hospital Clínico Universitario, Unidad de Salud Mental Delicias y Unidad de Salud Mental Infanto-Juvenil Hospital Clínico Universitario.

5.1.3. Origen de las muestras fecales

El presente trabajo de investigación fue planteado como un estudio de casos y controles. Se basa en las muestras fecales de pacientes con patología gastrointestinal remitidas entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2018 para diagnóstico microbiológico y parasitológico al Servicio de Microbiología y Parasitología del HCU Lozano Blesa. En conjunto se analizaron 6087 muestras de 3.682 pacientes con un rango de edad de 0 a 93 años , incluyendo personas de otros países que también tenían acceso al sistema público de salud, procedentes principalmente de zonas tropicales y subtropicales. En algunos casos se analizaron hasta tres muestras obtenidas en días alternos. Los pacientes positivos a *Blastocystis* por microscopía óptica fueron definidos como casos y los que obtuvieron un resultado negativo se definieron como controles en el estudio.

5.1.4. Material de laboratorio

5.1.4.1. Microscopía

Para el estudio microscópico se utilizó un microscopio óptico LEICA Microsystems CMS Gmbh, Wetzlar, Germany, modelo DM2000 LED, equipado con un revólver de cinco objetivos intercambiables (de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x). Las mediciones pertinentes para mejor identificación de las formas parásitas se realizaron con un ocular micrométrico calibrado para todos los objetivos del microscopio. Para fotografiar los parásitos se utilizó una máquina fotográfica FUJIFILM modelo FINEPIX JX y también un microscopio NIKON modelo ECLIPSE 80i, equipado con revólver de cinco objetivos intercambiable (de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x), que lleva conectada una cámara fotográfica NIKON modelo DIGITAL CAMARA INTENSILIGHT C-HGFI.

5.1.4.2. Equipamiento para Biología molecular

Para el estudio de biología molecular se utilizaron varios instrumentos que se describen a continuación.

- Centrífuga de laboratorio 5425, Eppendorf®.
- Termocicladores MiniCycler™ MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.
- Gel de electroforesis preparado con agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac), TBE X 0.5 (Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001M, pH 8) y bromuro de etidio 0.5 µg/ml.
- Transiluminador Vilber Lourmat™ Mesas UV - Fisher Scientific para visualización de los fragmentos de ADN y para la captura de las fotos se usó un capturador de imágenes Vilber Lourmat™ - Fisher Scientific.
- La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, donde se realizó secuenciación Sanger con el equipo 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, rama de Thermo Fisher, Foster City, California, USA).

5.2. Métodos

5.2.1. Descripción de variables analizadas

En los pacientes objeto de estudio se registraron diversas variables demográficas, antropométricas y médicas mediante el programa informático de laboratorio Modulab® Werfen Gold versión 2.0, y el programa electrónico Intranet (web del Servicio Aragón de Salud). Las variables (categóricas) analizadas para determinar su posible asociación con la infección por *Blastocystis* fueron:

5.2.1.1. Variables analizadas en casos y controles

- **Origen demográfico:** España, resto de Europa, África, América y Asia.
- **Grupo de edad:** se definen dos grupos, de ≤ 16 años y de > 16 años
- **Sexo:** masculino y femenino.
- **Índice de masa corporal (IMC) categorizado:** bajo peso (< 18,4 Kg/m²), normopeso (18,5-24,9 Kg/m²), sobrepeso (25 - 29,9 Kg/m²) y obesidad 30 - > 40 Kg/m²).

- **Tratamiento inmunosupresor:** quimioterapia, anticuerpos monoclonales, antirretrovirales, análogos de nucleósidos, corticoides.
- **Síntomas gastrointestinales:** diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos, estreñimiento, anorexia, fiebre, aerofagia, halitosis, urticaria, prurito anal y dispepsia
- **Comorbilidades con:** enfermedad celíaca (EC), diabetes mellitus tipo 2 (DM), síndrome del intestino irritable (SII) y cáncer.
- **Parámetros de laboratorio:** glucosa (82 - 115 mg/dL), hemoglobina glicosilada (4,6 - 5,7 %), hemoglobina (12 - 15,3 g/dL) y eosinofilia relativa (2-10%). Esta parte de la glucosa no la veo clara: lo que marcas son los rangos observados?? Porque se puede tener más de 115, desde luego. Lo mismo con los otros parámetros.
- **Co-infecciones:** con bacterias patógenas u otros protozoos entéricos o helmintos.
- **Edad e IMC:** que también se analizaron como variables continuas.

5.2.1.2. Variables analizadas exclusivamente en los casos

- **Subtipos de *Blastocystis*:** subtipos ST1, ST2, ST3 y ST4.

5.2.2. Análisis microscópico de las muestras fecales

5.2.2.1. Preparación de las muestras fecales

Las muestras fecales recibidas en el laboratorio fueron conservadas con SAF (acetato de sodio: 15 g, ácido acético glacial: 20ml, formol: 40ml, agua destilada: 925ml) (Fabián de Estrada et al., 2003) y concentradas por sedimentación para investigar posteriormente por microscopía óptica la presencia de *Blastocystis* sp. y otros parásitos como protozoos (*Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba* spp., *Encephalitozoon hellem*, *Entamoeba* spp., *Giardia lamblia* e *Isospora belli*) y helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma intercalatum*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata* y *Trichuris trichiura*). La técnica de sedimentación es un método físico-químico de concentración basado en la mayor afinidad de los restos fecales por el solvente orgánico acetato de etilo, menos denso que el agua, de manera que las formas parásitas sedimentan durante la centrifugación (Navone et al., 2005).

Concretamente, se utilizó el Sistema para concentración Universal System, REAL[®], con el siguiente protocolo:

- **Protocolo de la técnica de concentración por sedimentación**

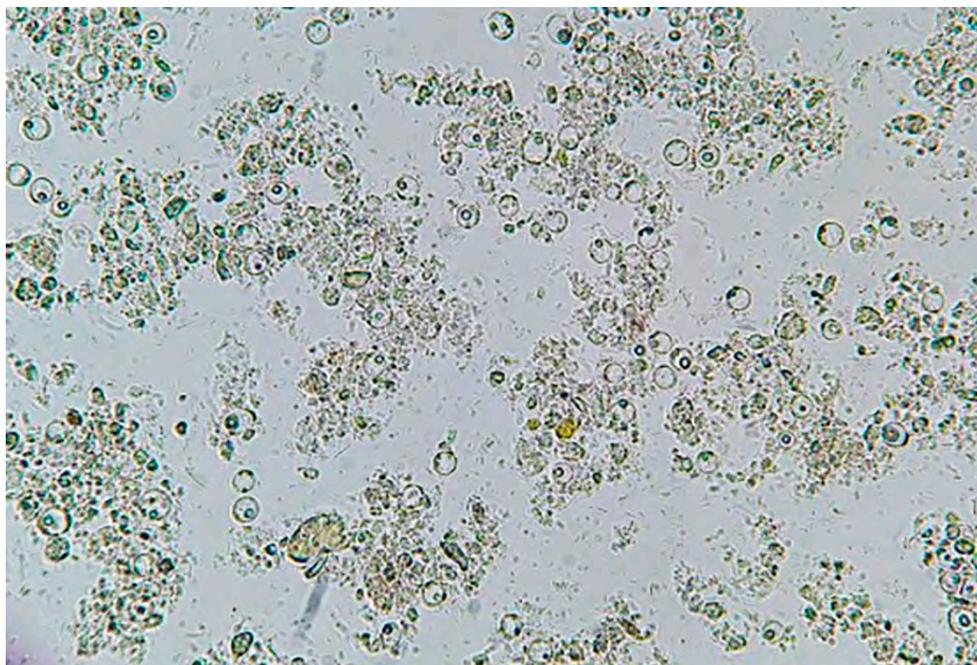
- Depositar 500 mg de muestra fecal del paciente en el tubo de SAF, agitar en vórtex dos minutos y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar la muestra a un tubo cónico de 15 ml y añadir acetato de etilo (5 ml aproximadamente). Mezclar enérgicamente y centrifugar a 500 x g, durante diez minutos.
- La centrifugación permite separar dos fases: la superior que contiene elementos grasos y la inferior (contiene partículas ligeras en suspensión) separadas por una interfase que contiene elementos ligeros y desnaturalizados. En el fondo del tubo se deposita el sedimento con los parásitos. Este procedimiento permite eliminar las grasas de la muestra y que los parásitos se depositen con los elementos no lipídicos en el sedimento.
- Desechar el sobrenadante y guardar el sedimento para su estudio microscópico.

5.2.2.2. Observación microscópica en fresco

De cada muestra fecal se analizaron hasta tres preparaciones en fresco, depositando en cada una 1 gota del sedimento entre portaobjetos y cubreobjetos (Cañavate et al., 2009). Las preparaciones fueron examinadas en toda su superficie con objetivos de 10x y 40x (figura 12).

El diagnóstico de *Blastocystis* sp. se basó en la morfología de los parásitos observados en la preparación, considerando positivas las muestras en las que se identificó al menos una forma compatible (vacuolar y/o granular) (Roberts et al., 2011). En las muestras positivas se realizó un recuento semicuantitativo, contabilizando las formas de *Blastocystis* en 10 campos (100x aumentos) para obtener la media de *Blastocystis*/campo (Figura 1). Una alícuota de heces frescas de cada muestra positiva a *Blastocystis* sp. fue conservada en nevera a 4 °C para su posterior estudio molecular. Finalmente, mediante el examen microscópico en fresco se investigó también la presencia de otros parásitos como protozoos y helmintos para identificar co-infecciones parasitarias.

Figura 12 Imagen de campo de microscopio (100× aumentos) obtenida en una muestra de un paciente infectado por *Blastocystis* sp. con alta carga parasitaria (imagen propia)



5.2.2.3. Observación microscópica con tinción de Ziehl-Neelsen modificada

Una gota del sedimento de cada muestra fecal fue teñida mediante la técnica de Ziehl-Neelsen modificada, que permite identificar específicamente la presencia de ooquistes de protozoos intestinales que tienen propiedades ácido alcohol resistente (AAR) como *Cryptosporidium* sp. Se siguió el siguiente protocolo (Henriksen and Pohlenz, 1981).

- Depositar una gota de sedimento en un portaobjetos, realizar una extensión fina y dejar secar a temperatura ambiente.
- Fijar con metanol la preparación seca, cubrir con fuscina fenicada durante 5 minutos y aclarar con agua.
- Decolorar con alcohol-ácido durante 20-30 segundos y aclarar con agua.
- Cubrir la preparación con azul de metileno durante 30 segundos y aclarar con agua.
- Secar la preparación y proceder a la visualización microscópica.

5.2.3. Estudio microbiológico de las muestras fecales

Para el estudio microbiológico, las muestras fecales se cultivaron en agar Hektoen (Biomérieux®, Ha, MO, Madrid-España), Mac Conkey (Biomérieux®, Ha, MO, Madrid-España), agar CCDA (Biomérieux®, Ha, MO, Madrid-España) y caldo selenita con resiembra y en Hektoen

después de la incubación durante 16 horas. En pacientes con sangre en las heces se añadió siembra en agar Mac Conkey/sorbitol. Las incubaciones se realizaron a 37°C excepto el agar CCDA que se incubó a 45°C en anaerobiosis (Blu F. et al., 2005). Se utilizó MALDI-TOF MS para identificar bacterias a nivel de especie (*Campylobacter* spp., *Arcobacter butzleri*, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli*) (Rychert, 2019).

5.2.4. Análisis molecular de las muestras positivas a *Blastocystis* sp.

5.2.4.1. Extracción de ADN

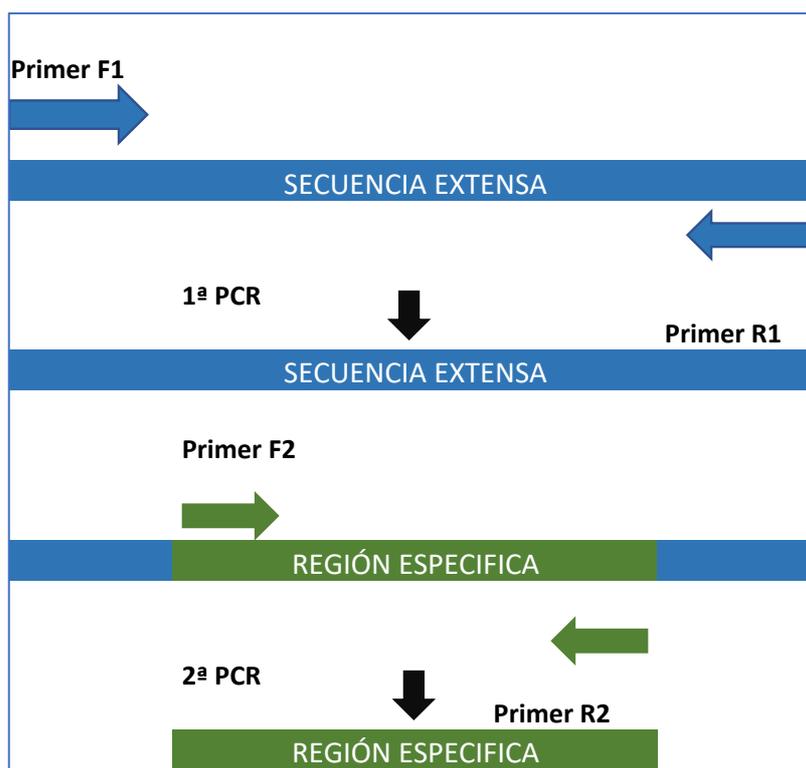
En las muestras fecales con presencia de *Blastocystis* sp. se realizó la extracción de ADN utilizando el kit comercial NORGEN BIOTEK CORP DNA Isolation Kit. El protocolo se basó en el siguiente procedimiento:

- Depositar en un microtubo una alícuota (200 mg) de la muestra de heces.
- Adicionar 1 ml de la solución de tampón de lisis L y vortear.
- Adicionar 100 µl de solución de lisis A, vortear 5 minutos y centrifugar 2 minutos a 14.000 RPM.
- Transferir 600 µl de sobrenadante a un nuevo tubo.
- Adicionar 100 µl de tampón de unión I, mezclar e incubar 10 minutos en hielo, centrifugar 2 minutos a 14.000 RPM.
- Transferir 500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo, adicionar 500 µl de etanol y vortear.
- Introducir una columna en cada tubo de recolección proporcionado en el kit y transferir a ellas 600 µl de la mezcla anterior, centrifugar 1 minuto a 14.000 RPM y desechar el sobrenadante.
- Repetir el procedimiento con el volumen restante de la mezcla anterior.
- Adicionar 500 µl del tampón de unión C a la columna y centrifugar un 1 minuto a 10.000 RPM, desechando el filtrado.
- Adicionar 500 µl de solución de lavado A a la columna y centrifugar un 1 minuto a 10.000 RPM, desechando el filtrado. Repetir este paso dos veces.
- Centrifugar la columna 2 minutos a 10.000 RPM para secar bien la resina y desechar el tubo de recolección.
- Introducir la columna en un nuevo tubo de recolección y adicionar 100 µl de tampón de Elución B, incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar 1 minuto a 10.000 RPM.
- El ADN genómico purificado se congela a -20 °C hasta su utilización.

5.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular descrita por Mullis et al., (1986), que tiene como objetivo amplificar la cantidad de copias de un fragmento de ADN partiendo de una cantidad mínima, obtenida inicialmente a través de la extracción. Para la identificación de *Blastocystis* sp. se utilizó una PCR anidada o “Nested PCR” (Bartlett y Stirling, 2003). Esta técnica es una variante de la PCR convencional que comprende en dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una de ellas, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más amplia, que contiene el segmento diana. Posteriormente, este producto de amplificación se utiliza como molde de una PCR secundaria con los cebadores internos para amplificar la región específica (Figura 13).

Figura 13 Descripción gráfica del funcionamiento de una PCR anidada



La PCR anidada utilizada en este estudio consistió en una primera amplificación de una región conservada en los eucariotas del gen 18S-rRNA y posteriormente en la amplificación de un fragmento de SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. (DeLong, 1992; Santín et al., 2011). Para la PCR primaria se utilizaron los cebadores universales EUK-F (5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT

CAT 3') y EUK-R (5' GCT TGA TCC TTC TGC TTC TTC ACC TAC 3') que amplifican una región conservada del 18S rRNA de eucariotas, en un volumen final de 50 µl (Tabla 6). La amplificación consistió en la desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s; 54 °C durante 30 s; y 72 °C durante 2 minutos, además de un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos (DeLong, 1992).

Tabla 6 Mezcla de reacción para amplificar por PCR (18S rRNA de eucariotas)

Tampón de reacción (x10)	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (25 mM)	0,2 mM
EUK-F (10 µM)	200 µM
EUK-R (10 µM)	200 µM
Taq DNA Polymerasa (5U/µl)	2,5 µL
H ₂ O (miliQ)	Completar volumen
ADN	5 µL

Para la PCR secundaria se amplificó un fragmento de la SSU-rRNA específica de *Blastocystis* sp. siguiendo el protocolo descrito por Santín et al., (2011) usando como plantilla el producto de la PCR primaria. Con los cebadores Blast 505-532 (5 'GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC 3') y Blast 998-1017 (5 'TGC TGC CGC TGT ACT TCA TC 3') se amplifica un fragmento de ~ 479bp, que contiene una región variable del gen SSU-rRNA que permite además el subtipado de *Blastocystis* sp. la mezcla de reacción de la PCR secundaria se realizó en un volumen final de 50 µl (Tabla 7). La amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s; 54 °C durante 30 s; y 72 °C durante 30 segundos, además de un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Las reacciones de ambas PCRs se llevaron a cabo en microtubos de 200 µl con los termocicladores MiniCycler TM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal cycler.

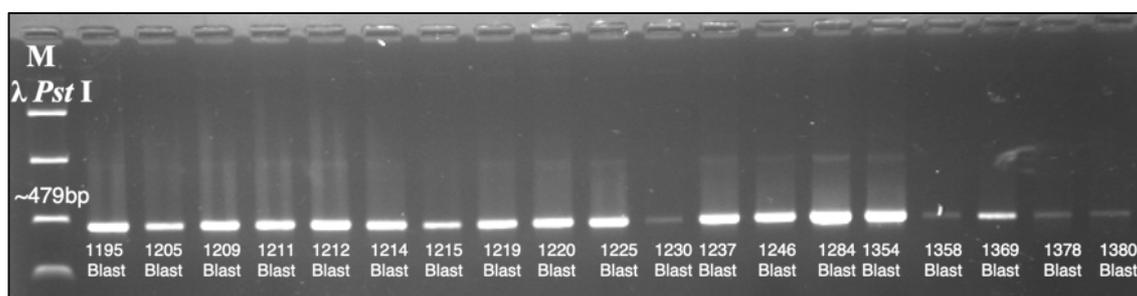
Tabla 7 Mezcla de reacción para amplificar por PCR (SSU-rRNA de *Blastocystis* sp.)

Tampón de reacción (x10)	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (25 mM)	0,2 mM
Blast 505-532 (10 µM)	1 µM
Blast 998-1017 (10 µM)	1 µM
Taq DNA Polymerasa (5U/µl) (IBIAN®)	2,5 µl
H ₂ O (miliQ)	Completar volumen
ADN	5 µl

5.2.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

A fin de verificar si la PCR generó amplicones del tamaño deseado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con los productos de la PCR secundaria. Los geles se prepararon diluyendo la agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac) en buffer TBE X 0.5 (Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001M, pH 8), a concentración 1,5% p/v. Los geles se tiñen con bromuro de etidio a concentración final 0.5 µg/ml. La electroforesis se desarrolló a 97-100 V durante 2 horas. El marcador de peso molecular utilizado fue DNA del Fago λ (Promega 502 µg/ml) digerido con *Pst*I (Advanced Biotechnologies 10U/µl). El marcador y las muestras fueron cargados con tampón de carga a razón de 3µl de tampón de carga mezclado con 5µl de muestra o del marcador. La presencia de fragmentos de ADN del tamaño esperado se visualizó con un transiluminador Viber Lourmet™ Mesas UV - Fisher Scientific y se tomaron fotos con un equipo de documentación de geles de la misma casa comercial (Figura 14).

Figura 14 Visualización en gel de agarosa: Amplificación del fragmento de SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de muestras positivas (imagen propia)



5.2.4.4. Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron con el Kit Speedtools PCR clean up (Biotools, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, fueron remitidos al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza donde se realizó una Secuenciación Sanger con el equipo 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, rama de Thermo Fisher, Foster City, California, USA). Las secuencias consenso obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalIW y editadas con Bioedit BioEdit versión 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Thompson et al., 1994; Hall, 1999).

Para confirmar que las secuencias correspondían a *Blastocystis* sp. se compararon con secuencias de referencia de los diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. disponibles en la Base de

datos GenBank® utilizando el programa BLAST de nucleótidos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) (Altschul et al., 1990, 1997). Todas las secuencias generadas en este estudio han sido depositadas en GenBank® con los números de acceso OP495227-OP495337.

2.2.5. Análisis filogenético

El análisis filogenético se llevó a cabo mediante Neighbor Joining (NJ), que se basa en distancias genéticas calculadas según el modelo 2-parametros o Kimura 2 (Kimura, 1980) utilizando el software MEGA5.10 (Tamura et al., 2011). Se utilizó como outgroup una secuencia procedente de *Proteromonas lacertae* (Nº acceso GenBank® U37108). Los árboles obtenidos se exportaron en formato Newick (permite representar árboles utilizando paréntesis y comas) (Olsen, 1990). Para la representación gráfica de los árboles filogenéticos obtenidos, se utilizó el software online iTOL v5 (<https://itol.embl.de/about.cgi>) (Letunic and Bork, 2021). Se realiza a continuación una descripción más detallada de estos métodos.

2.2.5.1. Neighbor Joining (NJ)

Neighbor Joining (NJ) es un proceso de construcción de árboles que utiliza el enfoque de distancia donde se busca la distancia mínima entre cada par de secuencias para estimar el mejor árbol, minimizando la suma de la longitud de cada rama. Se puede utilizar con cualquier tipo de datos de distancia (Saitou and Nei, 1987) y una de sus ventajas es la facilidad y rapidez para ejecutarlo, en gran parte porque la alineación múltiple se ha reducido a una tabla de distancias por pares entre secuencias. En el presente estudio se aplica el modelo Kimura 2 (K2P), que es una extensión del modelo básico (Edgar, 2004; Warnow, 2012). El modelo K2P diferencia entre dos tipos de sustituciones: transiciones y transversiones. Una transición es el cambio de una base purínica por otra base purínica, o de una base pirimidínica por otra base pirimidínica. Sin embargo, cuando el cambio es de una base purínica por una pirimidínica o viceversa, entonces es transversión. El modelo Kimura 2 asume que la tasa de transiciones es diferente de la tasa de transversiones, y considera sustituciones indel junto con transiciones y transversiones (Mahadani et al., 2022).

2.2.5.2. Análisis de bootstrap

El análisis de Bootstrap es un enfoque común utilizado para extraer conclusiones estadísticas sobre árboles filogenéticos. El término "bootstrapping" fue definido por Efron (1979) como "obtener estimaciones de error en situaciones no estándar volviendo a muestrear el conjunto de datos muchas veces para proporcionar una distribución contra la cual se pueden probar las hipótesis". Tras la introducción del "bootstrap", Felsenstein (1985) propuso usarlo como método para obtener límites de confianza en filogenias moleculares. Para los datos de secuencia, las posiciones en la alineación múltiple se vuelven a muestrear y se calcula un nuevo mejor árbol. Este proceso se repite un número elevado de veces. La proporción de muestras en las que se recupera un clado se indica como un porcentaje y se denomina "valor de bootstrap" o "porcentaje de bootstrap". El porcentaje generalmente se indica en la figura del árbol al lado del clado relevante. Cuanto mayor sea el valor obtenido, mayor será la confianza que tengamos en la agrupación indicada por ese nodo en el árbol. En el presente trabajo, la validez de los nodos obtenidos fue estimada mediante el procedimiento "Bootstrap" con 1.000 repeticiones. Para evitar saturar los nodos con la introducción de todos los porcentajes de Bootstrap, se eligió el método de colores, donde el verde indica que las ramas tienen un soporte total (100% o 1/1), mientras que el color rojo indica un soporte bajo.

2.2.5.3. Diversidad genética

Para estudiar la diversidad genética de las secuencias se utilizó el programa DNAsp v6.12.01 (<http://www.ub.edu/dnasp/>; Universidad de Barcelona, España) (Rozas et al., 2017). Los parámetros utilizados para medir la diversidad genética entre secuencias fueron: número de sitios (polimórficos) (S), Número de haplotipos (h), Diversidad de haplotipos (genes) (Hd) y Diversidad de nucleótidos (π). A continuación, se describen brevemente estos conceptos:

-Número de sitios polimórficos (s): Se dice que un sitio es polimórfico cuando en diferentes secuencias se obtienen distintos nucleótidos en ese sitio o posición. (Frankham et al., 2002).

-Número de haplotipos (h): La combinación particular de sitios ligados encontrados en una región específica del genoma se llama haplotipo, un genotipo en miniatura. Haplotipo se introdujo originalmente como un concepto para describir la constitución genética del locus de histocompatibilidad mayor, una región que especifica proteínas de importancia en el sistema

inmunitario. El concepto ahora se ha ampliado para describir la combinación particular de alelos o sitios de restricción (o cualquier otro marcador genético) ligados, presente en alguna área definida del genoma (Lewin, 2004). Por lo que respecta al análisis de secuencia, un haplotipo es cada combinación o sucesión de nucleótidos encontrada en la secuenciación de un fragmento en diferentes individuos: basta con una sustitución en un solo nucleótido para que se considere que existe un nuevo haplotipo.

-Diversidad de haplotipos (genes) (H_d): La métrica de diversidad de haplotipos fue introducida por primera vez por Nei (1987), como la probabilidad de que dos haplotipos muestreados aleatoriamente sean diferentes, si bien varios enfoques han refinado el marco teórico y la implementación real en las redes de haplotipos (Branders and Mardulyn, 2016; Leigh and Bryant, 2015). La diversidad de haplotipos, que varía entre cero (todos los haplotipos son idénticos) y uno (todos los haplotipos son diferentes), se ha mantenido como la métrica preferida y se ha utilizado universalmente para describir rápida y simplemente cuán genéticamente diversas son las poblaciones o los conjuntos de individuos o muestras analizados.

-Diversidad de nucleótidos (π): Es el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias (Nei, 1987).

-Alelos: En el caso de las secuencias 18S de *Blastocystis*, existe un sistema de clasificación de los haplotipos denominado en inglés Multi Locus Sequence Typing (MLST) (<http://pubmlst.org/blastocystis/>) que trata de agrupar todas las secuencias no solo a nivel de subtipo, sino también a nivel de “alelos” o variantes. Para ello se comparan las secuencias obtenidas con otras de referencia, y se asignan al alelo más semejante (Stensvold et al., 2012; Jolley et al., 2018). A fecha 30 de enero de 2023, la base de datos contiene 162 alelos para el gen que nos ocupa en la presente Tesis.

2.2.6. Análisis epidemiológico-estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se llevaron a cabo con el software IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.). Para las variables cualitativas se calcularon proporciones y porcentajes; se utilizó el chi-cuadrado de Pearson (con corrección de continuidad para tablas de 2x2) o alternativamente, la prueba exacta de Fisher (número esperado < 5) para las comparaciones entre los grupos de casos y controles. Para comparaciones múltiples (más de dos categorías) se utilizó la corrección de Bonferroni. La edad (años), el IMC

(kg/m²) y los parámetros sanguíneos (concentraciones de glucosa, hemoglobina glicosilada y hemoglobina y eosinofilia relativa) fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilks para verificar que se distribuían normalmente. La edad se describió mediante media y error estándar (ES), mientras que la mediana y el rango intercuartílico [RIQ] se utilizaron para resumir las variables cuantitativas que no se distribuyeron normalmente. Se utilizó la prueba T para comparar la edad entre casos y controles, mientras que la prueba U de Mann-Whitney se aplicó para las comparaciones con el resto de variantes cuantitativas, de distribución no normal. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Aquellas variables que mostraron diferencias significativas entre casos y controles fueron seleccionadas para el análisis de regresión logística. La asociación de estas variables (variables independientes) con el estado de caso/control (variable dicotómica dependiente; etiquetas de valor: caso=1, control=0) se determinó mediante regresión logística binomial. El modelo se ajustó utilizando un procedimiento paso a paso (método: hacia delante; prueba de Wald); los niveles de significación para las variables de entrada y salida fueron $p \leq 0,05$ y $p \geq 0,10$, respectivamente (Hocking, 1976). Se utilizó el parámetro R² de Nagelkerke para estimar la proporción de variación en la variable dependiente que puede ser explicada por el modelo. La capacidad del modelo para discriminar entre casos y controles se evaluó mediante sus parámetros de precisión: sensibilidad (S: tasa de verdaderos positivos), especificidad (E: tasa de verdaderos negativos), valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN: proporciones de resultados positivos y negativos en pruebas diagnósticas que son resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos, respectivamente) (Fletcher y Fletcher, 2005).

La medida general de discriminación estuvo representada por el área bajo la curva ROC o curva de características operativas del receptor) (Hilbe, 2005). Se estimó el intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %) tanto para los parámetros de precisión como para el área bajo la curva ROC.

En el estudio de las co-infecciones se consideran 21 variables (20 variables correspondientes a bacterias patógenas, helmintos y protozoos, más 1 variable para *Blastocystis*). Eran variables categóricas, codificadas como 0 y 1 (ausencia o presencia de un determinado patógeno, respectivamente). Se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) para reducir un gran conjunto de variables de co-infecciones a un conjunto más pequeño de variables (componentes principales), que representan la mayor parte de la varianza en las variables originales; el ACP proporcionó una base de significación estadística para la presencia

de dos o más microorganismos en el mismo individuo. Se eliminaron del estudio los microorganismos presentes solo en unos pocos individuos o aquellos que carecían de relación entre sí; la co-infección en estos casos podría ser simplemente un evento fortuito.

El índice KMO (índice de Kaiser-Meyer-Olkin) mide la relación lineal entre las variables; el índice KMO para una variable en particular debe ser $> 0,5$ para que esa variable sea considerada para ACP (Kaiser, 1974). Se utilizaron el criterio del valor propio uno (Kaiser, 1960) y el gráfico de sedimentación (Cattell, 1966) para decidir el número de componentes a retener. Se optó por la rotación (Cattell, 1966) ortogonal (Varimax). Dado que estamos interesados en agrupar a los individuos sobre la base de las co-infecciones, se aplicó un análisis de conglomerados en los componentes principales retenidos. Inicialmente se utilizó un procedimiento aglomerativo jerárquico, creando los conglomerados mediante el método de Ward para definir el número de conglomerados por la “regla del codo” (elbow rule). Posteriormente usamos el procedimiento de k-medias para formar los conglomerados (Ketchen, Jr y Shook, 1996). Estos clusters son grupos de individuos que comparten características similares sobre co-infecciones (o ausencia de co-infecciones); por lo tanto, las características parasitarias de estos grupos pueden interpretarse como las co-infecciones (o ausencia de co-infecciones) más interesantes, en función de sus frecuencias y la asociación significativa de los parásitos involucrados.

6. RESULTADOS

6.1. Epidemiología clínica

En este estudio resultaron positivas a *Blastocystis* sp. las muestras fecales de 338 pacientes (9,2%) que fueron incluidos como casos. El grupo control lo constituyeron los 3.344 pacientes restantes que resultaron negativos a *Blastocystis* sp. Por lo tanto, la proporción de grupo de casos y controles fue de 1:9,89 (\approx 1:10). En la Tabla 8 se muestra la distribución de los parámetros demográficos/antropométricos, además de información sobre el tratamiento con fármacos inmunosupresores en pacientes negativos y positivos a *Blastocystis* sp. La mayoría de las variables mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles.

En relación con el origen geográfico, el porcentaje de pacientes procedentes de España fue significativamente menor en los casos que en los controles. La situación se invierte en los pacientes procedentes de fuera de Europa, en los cuales la proporción fue significativamente mayor en los casos, con diferencias más relevantes sobre todo en los procedentes de África y América (Centroamérica y Sudamérica, más un paciente *Blastocystis* negativo de EEUU). Teniendo en cuenta la edad con un punto de corte situado en 16 años (niño vs adulto), no se detectaron diferencias significativas entre casos y controles; sin embargo, los casos eran significativamente más jóvenes que los controles cuando la edad fue considerada como variable cuantitativa continua.

Los individuos con bajo peso fueron significativamente más frecuentes entre los casos que en los controles, mientras que las personas con peso normal o con sobrepeso fueron significativamente más frecuentes en los controles. Cuando el índice de masa corporal (IMC) se analizó como variable cuantitativa también se observaron diferencias significativas entre casos y controles, con valores más bajos en los casos.

El tratamiento inmunosupresor con quimioterapia, anticuerpos monoclonales o fármacos antirretrovirales fue significativamente más frecuente en los casos que en los controles, pero el tratamiento con corticoides fue más frecuente en los controles. No se observaron diferencias significativas entre casos y controles cuando se analizaron las variables sexo y proporción de pacientes en tratamiento con análogos de nucleósidos.

Tabla 8 Distribución de parámetros demográficos/antropométricos y tratamiento inmunosupresor en casos (pacientes positivos a *Blastocystis*) y controles (pacientes negativos a *Blastocystis*)

Variable	Pacientes positivos a <i>Blastocystis</i>	Pacientes negativos a <i>Blastocystis</i>	Valor - p
Origen geográfico			<0,001
España	215/337 (63,8%) ^a	2712/3343 (81,1%) ^b	
Resto de Europa	33/337 (9,8%) ^a	267/3343 (8,0%) ^a	
África	48/337 (14,2%) ^a	165/3343 (4,9%) ^b	
América	30/337 (8,9%) ^a	144/3343 (4,3%) ^b	
Asia	11/337 (3,3%) ^a	55/3343 (1,6%) ^b	
Grupos de edad			0,140
≤ 16 años	148/338 (43,8%)	1321/3344 (39,5%)	
> 16 años	190/338 (56,2%)	2023/3344 (60,5%)	
Sexo			0,125
Masculino	180/338 (53,3%)	1629/3344 (48,7%)	
Femenino	158/338 (46,7%)	1715/3344 (51,3%)	
IMC categorizado			< 0,001
Peso bajo (< 18,4)	95/276 (34,4%) ^a	266/2349 (11,3%) ^b	
Normal (18,5 - 24,9)	92/276 (33,3%) ^a	939/2349 (40%) ^b	
Sobrepeso (25 - 29,9)	55/276 (19,9%) ^a	891/2349 (37,9%) ^b	
Obesidad (30 - 40)	34/276 (12,3%) ^a	253/2349 (10,8%) ^a	
Tratamiento inmunosupresor			
Quimioterapia	6/337 (1,8%)	1/3344 (0%)	< 0,001
Anticuerpos monoclonales	3/337 (0,9%)	0/3344 (0%)	0,001
Medicamentos antirretrovirales	3/337 (0,9%)	0/3344 (0%)	0,001
Análogos de nucleósidos	1/337 (0,3%)	47/3344 (1,4%)	0,124
Corticosteroides	3/337 (0,9%)	965/3344 (28,9%)	< 0,001
Edad (años)*	30,18±1,294	36,11±0,511	<0,001
IMC (Kg/m²)*	21,21 [9,51]	24,89 [5,10]	<0,001

* Variable cuantitativa. Los datos se informan como recuentos (%), excepto la edad (años), que se describe como media ± DE, y el IMC (kg/m²), que se resume como mediana y rango intercuartílico [RIQ]. ^{a,b}: Los valores dentro de una fila con diferentes superíndices difieren significativamente en $p < 0,05$.

Los síntomas clínicos, enfermedades subyacentes, co-infecciones con bacterias patógenas u otros parásitos entéricos y los resultados de las pruebas de laboratorio en casos y controles se resumen en la Tabla 9.

La mayoría de síntomas fueron significativamente más comunes en los casos que en los controles, incluidos dolor abdominal, náuseas, anorexia, aerofagia, halitosis, urticaria, prurito anal y dispepsia. En cambio, la presencia de diarrea y fiebre fue más frecuente en los controles que en los casos, existiendo diferencias estadísticamente significativas en la presencia de fiebre.

No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos para las comorbilidades, a excepción de la diabetes tipo 2, que fue más frecuente en los casos, mientras que el síndrome del intestino irritable (SII) fue significativamente más frecuente en los pacientes negativos a *Blastocystis*. No hubo diferencia en los parámetros bioquímicos entre pacientes infectados y no infectados por *Blastocystis*. Sin embargo, se encontraron diferencias altamente significativas para la eosinofilia relativa, con valores muy superiores en los casos.

Tabla 9 Síntomas clínicos, comorbilidades, co-infecciones y parámetros hematológicos/bioquímicos en casos (pacientes *Blastocystis* positivos) y controles (pacientes *Blastocystis* negativos)

Variables	Pacientes positivos para <i>Blastocystis</i>	Pacientes negativos para <i>Blastocystis</i>	Valor - p
Síntomas clínicos			
Diarrea	166/336 (49,4%)	1797/3344 (53,7%)	0,144
Dolor abdominal	275/336 (81,8%)	975/3344 (29,2%)	<0,001
Náusea	36/336 (10,7%)	29/3344 (0,9%)	<0,001
Vómito	47/336 (14,0%)	446/3344 (13,3%)	0,803
Estreñimiento	24/336 (7,1%)	323/3344 (9,7%)	0,160
Anorexia	34/336 (10,1%)	27/3344 (0,8%)	<0,001
Fiebre	18/336 (5,4%)	972/3344 (29,1%)	<0,001
Aerofagia	39/336 (11,6%)	53/3344 (1,6%)	<0,001
Halitosis	5/336 (1,5%)	4/3344 (0,1%)	0,001
Urticaria	103/336 (30,7%)	202/3344 (6,0%)	<0,001
Picor anal	32/336 (9,5%)	90/3344 (2,7%)	<0,001
Dispepsia	27/336 (8%)	88/3344 (2,6%)	<0,001
Comorbilidades			
Enfermedad celíaca	8/336 (2,4%)	48/3344 (1,4%)	0,264
Diabetes tipo 2	59/309 (19,1%)	182/3344 (5,4%)	<0,001
SII	6/336 (1,8%)	160/3 344 (4,8%)	0,017
Cáncer	18/336 (5,4%)	194/3344 (5,8%)	0,833
Co-infecciones			
Bacterias patógenas	30/336 (8,9%)	6/3344 (0,2%)	<0,001
Helmintos	22/336 (6,5%)	22/3344 (0,7%)	<0,001
Protozoos	25/336 (7,4%)	72/3344 (2,2%)	<0,001
Parámetros de laboratorio			
Glucosa *	87,00 [14,0]	87,00 [14,0]	0,379
Hemoglobina glicosilada *	5,70 [1,0]	5,50 [0,9]	0,523
Hemoglobina *	14,10 [1,80]	14,10 [2,50]	0,903
Eosinofilia relativa *	3,20 [4,5]	0,10 [0,1]	<0,001

* Variable cuantitativa. Los datos se informan como recuentos (%) excepto las variables cuantitativas, que se describen como mediana y rango intercuartílico [RIQ], ** Síndrome de intestino irritable

Algunas variables relacionadas con la ausencia/presencia de patógenos no fueron incluidas en el análisis de componentes principales (ACP), cuyos resultados se describen en la Tabla 10. Por ejemplo, en un escaso número de individuos (< 2) se observó presencia de *Arcobacter butzleri*, *Shigella*, *Schistosoma intercalatum*, *Taenia saginata* y *Encephalitozoon hellem*; por lo tanto, estos agentes no fueron considerados para ACP. Asimismo, se excluyeron ciertas variables cuyo índice KMO fue inferior a 0,5, incumpliendo el supuesto básico para ACP. Concretamente, este fue el caso de las infecciones por *Aeromonas* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Hymenolepis nana* y *Trichuris trichiura*.

Por lo tanto, solo *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Dientamoeba*, *Entamoeba* sp., *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* y *Blastocystis* sp. fueron considerados para ACP. De acuerdo a los criterios expuestos en el apartado de metodología estadística, se retuvieron tres componentes principales. El porcentaje acumulado de varianza explicado por ellos fue de 46,996%.

Tabla 10 Matriz de componentes rotados: cargas de los componentes principales 1, 2 y 3 sobre variables relacionadas con la ausencia/presencia de patógenos. Los coeficientes por debajo de 0,3 (valor absoluto) se han suprimido para facilitar la interpretación.

Parásito	Componente Principal		
	1	2	3
<i>Isospora belli</i>	0,710		
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0,601	-0,433	
<i>Giardia lamblia</i>	0,594		
<i>Dientamoeba</i> sp.	0,429		
<i>Entamoeba</i> sp.		0,647	
<i>Ascaris lumbricoides</i>		0,619	
<i>Enterobius vermicularis</i>			0,801
<i>Blastocystis</i> sp.		0,308	0,607

La Tabla 10 muestra la matriz de componentes rotados (el resultado clave de ACP); describe las estimaciones de los coeficientes de correlación entre cada una de las variables originales y los componentes estimados. Por lo tanto, ACP resume la información sobre co-infecciones partiendo de 21 variables originales hasta sólo 3 variables (tres componentes principales: 1, 2 y 3). Los coeficientes por debajo de 0,3 (valor absoluto) han sido suprimidos para facilitar la interpretación. Los valores positivos indican que una variable y un componente principal están positivamente correlacionados, es decir que el aumento en uno resulta en un aumento en el otro. Las cifras negativas indican una correlación negativa. Cuanto mayor es el

valor absoluto (ya sea positivo o negativo), mayor es el efecto de una variable sobre ese componente principal.

El componente principal 1 resume la información sobre la presencia de cuatro microorganismos: *Isoospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, con mayor peso de los tres primeros y menor en el caso de *Dientamoeba* sp.

La variable con mayor peso en el componente principal 3 es *Enterobius vermicularis* y menor peso de *Blastocystis* sp.

Finalmente, el componente principal 2 resume la información sobre la presencia de *Entamoeba* sp., *A. lumbricoides*, *Blastocystis* sp. y *S. stercoralis*, con mayor peso de los dos primeros y menor en los dos últimos (peso negativo en *S. stercoralis*).

Una vez que el conjunto de variables originales se ha reducido mediante ACP, se deben estudiar las co-infecciones mediante agrupamiento. Este análisis genera grupos de individuos que comparten características similares, en cuanto a las variables incluidas en los tres componentes principales; por lo tanto, esto proporciona una visión simplificada de las co-infecciones más relevantes en la muestra de individuos considerada. La Tabla 11 muestra el resultado del agrupamiento basado en los tres componentes principales retenidos. El primer grupo incluía a la mayoría de los individuos negativos a *Blastocystis* ($3.277/3.344 = 98,0\%$), mientras que el sexto grupo contenía la mayoría de los pacientes positivos a *Blastocystis* ($301/336 = 89,50\%$), sin presencia de otros parásitos en ninguno de ambos grupos. Por lo tanto, la mayoría de los individuos estudiados, ya sea casos o controles, no presentaron ninguna co-infección. Cada grupo de individuos se refería a un microorganismo en particular, ya que se incluyen la mayoría de los individuos que presentaron este microorganismo. En el grupo 2 se incluyen la mayoría de pacientes infectados por *G. lamblia* ($45/52 = 86,53\%$) junto con 9 de los 336 pacientes infectados con *Blastocystis* sp. ($2,7\%$). El grupo 3 incluyó a todos los pacientes infectados con *E. vermicularis* ($n= 16$) así como 8 pacientes positivos para *Blastocystis* ($2,4\%$). El grupo 4 contenía todos los pacientes infectados con *Entamoeba* sp. ($n= 19$) junto con 12 pacientes positivos para *Blastocystis* sp. ($3,6\%$). Finalmente, todos los pacientes infectados con *S. stercoralis* fueron asignados al grupo 5 ($n= 6$), que también incluía 6 pacientes infectados por *Blastocystis* ($1,78\%$). Puesto que este estudio se centra en *Blastocystis*, la Tabla 12 proporciona una descripción más precisa de las co-infecciones de este microorganismo con otros.

Tabla 11 Características de los individuos incluidos en los 6 agrupamientos obtenidos en el estudio. La ausencia o presencia de un patógeno en particular se registró como - y +, respectivamente

Cluster	Frecuencia	<i>Ascaris lumbricoides</i>		<i>Dientamoeba sp.</i>		<i>Strongyloides stercoralis</i>		<i>Entamoeba sp.</i>		<i>Enterobius vermicularis</i>		<i>Gardia lamblia</i>		<i>Isospora belli</i>	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1	3277/3680 (89,0%)	3277		3277		3277		3277		3277		3277		3277	
2	53/3680 (1,4%)	53		45	8	53		53		53		8	45	53	
3	16/3680 (0,4%)	16		16		16		16			16			16	
4	23/3680 (0,6%)	18	5	22	1	23	4	4	19	23		21	2	22	1
5	10/3680 (0,3%)	10		9	1	4	6	10		10		5	5	5	
6	301/3680 (8,2%)	301		301		301		301		301		301		301	
Total	3680	3675	5	3670	10	3674	6	3661	19	3664	16	3628	52	3674	6

Tabla 12 Pacientes incluidos en el análisis de componentes principales. Descripción del número de pacientes infectados por *Blastocystis* y co-infecciones

Cluster	Nº pacientes <i>Blastocystis</i> positivos	Pacientes con co-infección	Co-infección
2	9	4/336 (1,2%)	<i>Giardia lamblia</i>
		5/336 (1,5%)	<i>Dientamoeba</i> sp.
3	8	8/336 (2,4%)	<i>E. vermicularis</i>
4	12	6/336 (1,8%)	<i>Entamoeba</i> sp.
		1/336 (0,3%)	<i>Entamoeba</i> sp./ <i>G. lamblia</i>
		4/336 (1,2%)	<i>A. lumbricoides</i>
		1/336 (0,3%)	<i>A. lumbricoides</i> / <i>Dientamoeba</i> sp. / <i>Entamoeba</i> sp./ <i>G. lamblia</i> / <i>I. belli</i>
5	6	4/336 (1,2%)	<i>G. lamblia</i> / <i>I. belli</i>
		1/336 (0,3%)	<i>S. stercoralis</i> / <i>I. belli</i>
		1/336 (0,3%)	<i>Dientamoeba</i> sp./ <i>S. stercoralis</i> / <i>I. belli</i>

La Tabla 13 muestra el modelo final de regresión logística binomial que fue estadísticamente significativo (χ^2 (11) = 1955,696; $p < 0,001$) y explica el 94,6% de la varianza total (Nagelkerke R^2). La probabilidad de estar infectado con *Blastocystis* sp. fue similar entre los individuos de España y el resto de Europa, pero aumentó significativamente en los individuos de América y especialmente de África. No se observaron diferencias significativas con los individuos de Asia, lo que puede deberse al escaso número de pacientes que conformaban este grupo.

Algunos síntomas como el dolor abdominal y la anorexia, así como el padecimiento de diabetes tipo 2 se asociaron significativamente con la infección por *Blastocystis* sp., pero el tratamiento con corticoides se asocia con la ausencia de este microorganismo. También se observó una asociación estadística en este caso muy significativa entre infección por *Blastocystis* sp. y presencia de bacterias patógenas y halitosis. Concretamente, los individuos con co-infecciones bacterianas tenían hasta 132,960 veces más posibilidades de estar infectados por *Blastocystis* sp., probabilidad que se incrementa hasta 315,220 veces cuando se detecta halitosis. No obstante, la asociación más significativa corresponde a la presencia de eosinofilia relativa, puesto que a medida que esta variable aumenta en 1 unidad, la probabilidad de infección por *Blastocystis* sp. se incrementa más de un millón de veces. Finalmente, destaca la alta fiabilidad de los parámetros para el modelo de regresión logística binomial, que fueron los siguientes: Sn = 0,967 (IC 95 %: 0,969–0,998); Sp = 0,998 (IC 95 %: 0,996–0,998); VPP = 0,983 (IC

95 %: 0,968–0,997); VPN = 0,997 (IC 95 %: 0,995–0,999). El área bajo la curva ROC fue de 0,997 (IC 95%: 0,993-1,000; $p > 0,001$).

Tabla 13 Modelo final de regresión logística binaria, que muestra la asociación estadística entre infección por *Blastocystis* sp. con diversos parámetros como el origen del paciente, presencia de bacterias patógenas, dolor abdominal, anorexia, halitosis, diabetes tipo 2 y tratamiento con corticoides y eosinofilia relativa (variable cuantitativa)

Variable	B	EE	Wald	gl	Valor- <i>p</i>	Odds ratio (OR)	95% IC de Odds ratio	
							Lim. inferior	Lim. inferior
Origen geográfico			9,205	4	0,056			
Resto de Europa	-0,141	0,918	0,024	1	0,878	0,868	0,144	5,250
África	2,025	0,810	6,249	1	0,012	7,574	1,548	37,046
América	1,828	0,873	4,391	1	0,036	6,223	1,125	34,411
Asia	0,726	1,629	0,199	1	0,656	2,067	0,085	50,360
Bacterias patógenas	4,890	1,367	12,804	1	<0,001	132,960	9,130	1936,310
Dolor abdominal	2,568	0,576	19,901	1	<0,001	13,041	4,220	40,300
Anorexia	3,135	0,943	11,055	1	0,001	22,999	3,623	146,016
Halitosis	5,753	1,632	12,433	1	<0,001	315,220	12,875	7717,767
Diabetes tipo 2	2,021	0,722	7,837	1	0,005	7,547	1,833	31,070
Corticosteroides	-5,998	1,574	14,514	1	<0,001	0,002	0,000	0,054
Eosinofilia relativa *	7,008	0,658	113,374	1	<0,001	1105,260	304,259	4014,997
Constante	-9,487	0,831	130,250	1	<0,001	0,000		

B: coeficiente de regresión; EE: error estándar; Wald: Prueba de Wald; gl: grados de libertad; IC del 95%: intervalo de confianza del 95%, * variable cuantitativa

6.2. Epidemiología molecular

6.2.1. Subtipos de *Blastocystis* sp. identificados

En total se han subtipado 173 muestras positivas a *Blastocystis* sp., encontrando cuatro subtipos (ST) diferentes: ST1, ST2, ST3, ST4 (Tabla 14). Los subtipos del 1 al 4 son los más comúnmente descritos a nivel mundial y son frecuentemente encontrados en las heces de humanos (Seyer et al., 2017). La distribución porcentual revela el predominio de las variantes ST2 y ST3, que se observaron en un porcentaje similar de pacientes, seguidos por los subtipos ST1-ST4 que de nuevo fueron identificados en una cifra idéntica de personas infectadas (Tabla 14).

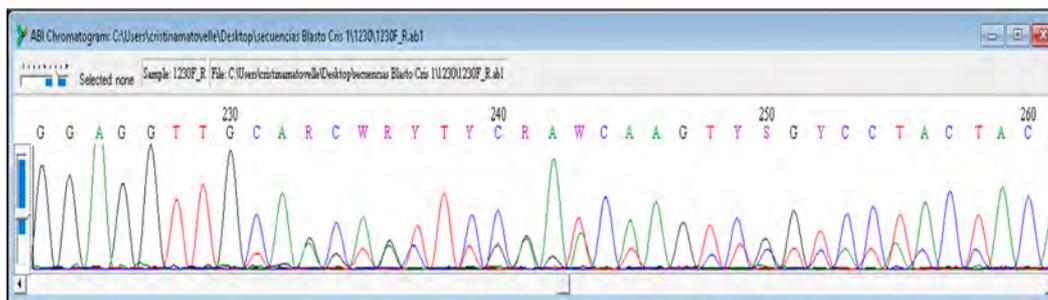
Tabla 14 Frecuencia y porcentaje de cada subtipo de *Blastocystis* sp.

Subtipo	Frecuencia	Porcentaje (%)
ST1	27	15,6
ST2	59	34,1
ST3	60	34,7
ST4	27	15,6
Total	173	100,00

Como ya se ha indicado, en el presente estudio, se utilizó en primer lugar el protocolo de Santín et al., (2011) para la amplificación por PCR del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de las muestras fecales positivas y posteriormente los productos de PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger. Cuando la secuenciación del producto de PCR de una muestra resultó en un rastro mixto con picos dobles en el análisis cromatográfico de los productos secuenciados por Sanger, se consideró que procedía de una infección mixta de *Blastocystis*. Varios estudios sugieren que estos productos pueden posteriormente clonarse y secuenciar para determinar la identidad exacta de los subtipos presentes (Meloni et al., 2012; El Safadi et al., 2014). En el caso de nuestro estudio, no realizamos clonaciones; sin embargo, los análisis cromatográficos fueron claros para identificar estas infecciones mixtas.

En total se identificaron infecciones mixtas por distintas variantes de *Blastocystis* sp. en 11 de las 173 muestras subtipadas (6,3%), de las cuales 4 correspondían a ST1 y 7 muestras identificadas como ST2. Esta circunstancia se puso en evidencia por la presencia de picos dobles en trazos de los cromatogramas procesados por secuenciación del gen SSU rADN mediante la técnica de Sanger (Figura 15). Estos picos dobles se observaron en una zona de aproximadamente 30 nucleótidos del total de la secuencia completa, mientras que el resto del trazo permitía identificar un ST en concreto.

Figura 15 Sección del cromatograma donde se evidencia picos dobles indicativos de infecciones mixtas. Secuenciación por el método Sanger del gen SSU-rRNA (imagen propia)



Otro hallazgo relevante fue la variación de subtipos identificados en distintas muestras de un mismo individuo, dato observado en un total de cuatro pacientes. En uno de ellos, la diferencia entre el primer muestro y el siguiente fue de tan sólo 1 día y en los restantes mediaron entre 3 y 9 días (Tabla 15). El primer paciente presentó el ST1 en la primera muestra y en el lapso de nueve días se encontró en la segunda muestra el ST3. En el caso del segundo paciente en un lapso de un día de diferencia presento primero el ST3 y luego el ST1. Curiosamente, el tercer paciente presentó ST1 en la primera muestra, tras tres días se encontró ST2 y tres días más tarde (seis desde la primera toma de muestra) se evidenció nuevamente ST1. El último paciente presentó el ST4 como primer resultado y a los tres días mostró ST2.

Tabla 15 Pacientes con variación de subtipos en muestras repetidas

Paciente	Fecha de la muestra	Subtipo	Edad (años)	País de nacimiento
1	17.09.18	ST1	2	Ucrania
	26.09.18	ST3		
2	3.10.18	ST3	70	España
	4.10.18	ST1		
3	9.01.18	ST1	8	Gambia
	12.1.18	ST2		
	15.01.18	ST1		
4	19.02.18	ST4	62	España
	22.02.18	ST2		

6.2.2. Comparación con otras secuencias depositadas en GenBank®

Se compararon las secuencias genéticas que se obtuvieron de *Blastocystis* sp. en este estudio con las secuencias de referencia de los diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. disponibles en la Base de datos GenBank® utilizando el programa BLAST de nucleótidos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) (Altschul et al., 1990;1997). Las 111 secuencias identificadas en este estudio se depositaron en dicha base de datos con los números de acceso OP495227-OP495337. Las comparaciones de las secuencias se observan en los Anexos 4-7 donde únicamente se han incluido aquellas que presentaban una mayor disparidad según el estudio filogenético. Cabe destacar que muchas de estas secuencias presentaban una homología del 100% con secuencias de origen animal depositadas en dicha base de datos (*Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus*) y una homología menor en cepas de origen humano lo que reforzaría el posible origen zoonótico del parásito.

6.2.3. Homología entre secuencias genéticas de cada subtipos

En primer lugar, se compararon entre sí todas las secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. obtenidas en este trabajo y que fueron depositadas en la base de datos GenBank®. Para ello se utilizó el programa BLAST de nucleótidos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) (Altschul et al., 1990, 1997).

Se obtuvo así la homología existente entre cada secuencia y las demás de su mismo subtipo. Cada secuencia se añadió y se comparó con el resto de secuencias que pertenecían al mismo subtipo, luego con los resultados obtenidos se elaboró una tabla de homologías para cada subtipo, elaborando de esta forma una tabla de homologías para cada subtipo (Tablas 16 a 19).

El rango de homologías entre las 17 secuencias del ST1 se situó entre el 94,26% (1008/1185 nucleótidos, observado en una sola combinación), y el 100% (observado en ocho combinaciones). La homología media fue de $97,77\% \pm 1,71\%$ (Tabla 16).

En el caso de las 31 secuencias parciales del ST2, la homología mínima fue del 94,72% (observada en cinco combinaciones), mientras que la máxima (100%) se obtuvo en 71 combinaciones. La media fue de $97,62\% \pm 1,76\%$ (Tabla 17).

Para las 43 secuencias del ST3 la homología mínima fue del 91,38% (obtenida en solo una combinación) mientras que 163 combinaciones alcanzaron la homología máxima, del 100%. En conjunto, la homología media fue de $99,26\% \pm 1,29\%$ (Tabla 18).

Finalmente, las muestras más homogéneas de nuestro estudio fueron las existentes entre las 20 secuencias del subtipo ST4 obtenidas: alcanzaron una homología media de $99,95\% \pm 0,09\%$. La homología mínima fue de 99,72% observada en tres combinaciones, mientras que 155 combinaciones alcanzaron la homología máxima posible (100%) (Tabla 19). Además, llama la atención que las homologías menores del 100% procedían solo de 2 secuencias (1069 y 1418).

En resumen, cabe decir que la homología de secuencias múltiples indicó que la similitud dentro de cada subtipos fue más alta en el ST4 ($99,95 \pm 0,09$) y ST3 ($99,26 \pm 1,29$), mientras que la similitud más baja fue en los ST1 ($97,77 \pm 1,71$) y ST2 ($97,62 \pm 1,76$).

Tabla 16 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA identificadas como ST1 de *Blastocystis*. Hubo un total de 136 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (94,26%)

		Secuencias del ST1																
		1008	1027	1064	1094	1095	1137	1167	1173	1185	1219	1242	1246	1310	1359	1365	1407	1424
1008																		
1027		95,06																
1064		95,24	99,41															
1094		95,06	99,35	98,71														
1095		95,62	99,41	100,00	98,91													
1137		95,52	99,71	99,71	99,12	99,74												
1167		95,54	99,41	100,00	98,91	99,74	99,74											
1173		95,80	99,69	99,07	99,71	99,15	99,43	99,15										
1185		94,26	99,33	98,65	99,44	98,88	99,09	98,88	99,09									
1219		95,89	99,71	99,49	99,12	99,54	99,74	99,47	99,43	99,09								
1242		95,63	99,41	98,90	100,00	98,98	99,21	98,94	99,72	99,39	99,24							
1246		96,13	95,32	96,01	94,41	96,13	95,83	96,11	94,93	94,19	95,58	95,03						
1310		95,63	99,71	99,23	98,91	98,92	99,47	98,77	99,72	98,63	99,54	99,49	95,30					
1359		95,63	99,71	99,23	99,41	99,31	99,47	99,21	99,72	99,09	99,54	99,49	95,30	100,00				
1365		95,63	99,71	98,97	99,73	99,13	99,47	99,26	100,00	99,15	99,31	99,49	95,30	99,13	99,54			
1407		95,89	99,71	99,23	99,73	99,35	99,47	99,26	100,00	99,18	99,54	99,75	95,30	99,36	99,77	99,78		
1424		95,89	99,71	99,23	99,18	98,91	99,47	98,76	100,00	98,58	99,54	99,75	95,30	99,78	99,77	99,34	99,56	

Tabla 17 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA identificadas como ST2 de *Blastocystis*. Hubo un total de 465 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (94,72%)

		Secuencias del ST2																																			
		1028	1035	1036	1038	1055	1065	1068	1075	1081	1120	1124	1128	1133	1136	1152	1166	1172	1179	1195	1198	1215	1255	1311	1349	1354	1369	1381	1383	1392	1442	1447					
99,08																																					
98,99	100,00																																				
98,98	100,00	96,08																																			
99,02	100,00	100,00	100,00																																		
98,62	99,08	99,72	95,77	100,00																																	
99,08	100,00	96,10	99,47	100,00	96,19																																
98,84	100,00	99,70	95,68	100,00	100,00	95,99																															
99,08	100,00	98,85	95,70	100,00	98,22	96,21	98,45																														
99,08	98,16	97,47	94,72	99,03	98,26	95,25	97,69	98,22																													
99,08	100,00	96,10	99,47	100,00	96,36	100,00	96,00	96,22	95,46																												
99,08	100,00	99,71	95,98	100,00	99,50	96,56	100,00	98,73	97,52	96,56																											
98,92	100,00	99,71	95,84	100,00	100,00	96,13	100,00	98,51	97,78	96,13	100,00																										
99,54	98,62	95,16	99,13	98,54	95,26	99,25	94,77	95,47	95,27	99,25	95,76	94,99																									
100,00	98,98	97,46	94,72	98,98	98,01	95,05	97,69	98,55	100,00	95,29	97,69	97,78	95,13																								
98,94	100,00	99,71	95,69	100,00	100,00	96,26	100,00	98,53	97,85	96,26	100,00	100,00	95,01	97,85																							
99,47	99,41	95,59	99,47	99,70	95,59	99,69	99,69	98,22	97,93	95,59	99,70	99,70	95,29	97,93	99,70																						
100,00	98,94	95,43	98,92	98,94	95,73	99,46	95,43	95,04	95,74	99,46	95,32	95,59	99,71	95,74	95,73	95,60																					
100,00	99,05	97,47	94,72	99,02	98,05	95,23	97,69	98,61	100,00	95,47	97,78	97,78	95,33	100,00	97,85	97,93	95,73																				
99,54	98,62	98,88	94,97	98,54	98,90	95,83	99,14	97,96	98,03	96,08	99,25	99,47	96,01	98,26	99,19	99,41	95,99	98,32																			
99,08	100,00	99,72	95,77	100,00	99,54	96,78	100,00	98,73	97,69	96,78	100,00	100,00	95,76	97,89	100,00	99,70	95,72	97,97	99,31																		
99,47	98,41	99,12	95,01	98,41	98,82	95,01	98,76	97,94	97,64	95,01	98,82	98,81	95,31	97,64	98,82	99,11	95,60	97,64	99,12	98,82																	
99,08	100,00	100,00	95,77	100,00	99,31	96,78	99,71	98,98	97,46	96,78	99,75	99,72	95,76	97,63	99,73	99,41	95,72	97,72	99,07	99,77	99,12																
99,08	100,00	96,10	99,47	100,00	96,51	99,56	96,00	96,22	95,65	100,00	96,53	96,14	99,25	95,57	96,27	95,60	99,46	95,71	96,29	96,79	95,03	96,79															
100,00	98,98	95,54	98,94	99,02	95,87	99,54	96,00	95,72	95,88	99,54	96,03	95,59	99,75	95,82	95,73	95,60	100,00	95,98	96,55	96,33	95,61	96,33	99,54														
100,00	99,02	97,38	94,81	98,92	97,67	94,81	97,58	98,51	100,00	94,81	97,62	97,67	94,99	100,00	97,67	97,92	95,39	100,00	97,97	97,67	97,62	97,38	94,81	95,39													
99,08	100,00	96,10	100,00	100,00	96,11	100,00	95,83	96,22	95,15	100,00	96,50	96,00	99,24	95,01	96,03	95,60	99,43	95,21	95,86	96,59	95,03	96,59	100,00	99,51	94,83												
98,41	99,47	99,42	95,42	99,47	99,74	95,62	99,71	98,23	97,67	95,99	99,71	99,72	94,76	97,67	99,73	99,41	95,45	97,67	98,96	99,73	99,12	99,46	96,13	95,45	97,38	95,74											
99,08	100,00	96,10	100,00	100,00	96,07	100,00	95,83	96,22	95,10	100,00	96,46	96,00	99,24	95,01	96,03	95,60	99,43	95,21	95,82	96,56	95,03	96,56	100,00	99,50	94,83	100,00	95,75										
98,62	99,54	99,72	95,50	99,51	99,06	96,50	99,42	98,73	97,18	96,50	99,49	99,44	95,95	97,36	99,46	99,11	95,45	97,46	98,83	99,53	98,82	99,77	96,50	96,03	97,09	96,31	99,19	96,31									
100,00	99,08	97,47	94,72	99,02	97,78	95,58	97,69	98,73	99,56	95,81	97,97	97,78	95,72	100,00	97,85	97,93	95,73	100,00	98,44	98,13	97,64	97,89	96,03	96,28	100,00	95,59	97,67	95,58	97,65								

Tabla 19 Homología entre las secuencias parciales del gen SSU-rRNA identificadas como ST4 de *Blastocystis*. Hubo un total de 190 combinaciones en el conjunto de datos final. El fondo rosa indica el rango máximo (100%) y el fondo verde el rango mínimo (99,72%)

		Secuencias del ST4																			
		1069	1074	1082	1123	1148	1158	1181	1192	1205	1211	1225	1250	1284	1288	1315	1316	1393	1398	1418	1419
	1069																				
	1074	99,74																			
	1082	99,72	100,00																		
	1123	99,75	100,00	100,00																	
	1148	99,72	100,00	100,00	100,00																
	1158	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00															
	1181	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00														
	1192	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00													
	1205	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00												
	1211	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00											
	1225	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00										
	1250	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00									
	1284	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00								
	1288	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00						
	1315	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00					
	1316	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00				
	1393	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00			
	1398	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00		
	1418	100,00	99,77	99,73	99,75	99,72	99,77	99,75	99,78	99,78	99,78	99,76	99,78	99,78	100,00	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78
	1419	99,75	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,78

6.2.4. Identificación de subtipos y alelos y su relación con el origen de los pacientes

Para identificar los alelos relevantes de las secuencias del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. identificadas en este estudio se utilizó la base de datos de tipificación de secuencias Multilocus de *Blastocystis* ST (18S rRNA) o llamado en inglés Multi Locus Sequence Typing (MLST) (<http://pubmlst.org/blastocystis/>) (Stensvold et al., 2012; Jolley et al., 2018). Debe señalarse aquí que un alelo no corresponde a un único haplotipo (es decir, una única secuencia). De hecho, el método propone alinear cada secuencia con secuencias de referencia de cada alelo; se admite que diferencias pequeñas no impiden la asignación a un alelo concreto (Figura 16). Este método permitió obtener los alelos correspondientes para cada una de las secuencias genéticas agrupadas por subtipos (Tabla 20). Además, se identificó el país de origen, edad y sexo del paciente correspondiente a cada secuencia genética analizada. La identificación de alelos y estudio filogenético se realizó con un total de 83 secuencias de *Blastocystis* que fueron el número de secuencias que se incluyeron en el árbol filogenético.

Figura 16 Ejemplo de asignación de alelos de las secuencias genéticas a través de la base de datos de tipificación de secuencias Multilocus de *Blastocystis* ST: Número de secuencia 1008 en el que se obtiene el alelo 2 (imagen propia)

PubMLST Public databases for molecular typing and microbial genome diversity

Home > Organisms > *Blastocystis* spp. > *Blastocystis* typing > Sequence query

Sequence query

Please paste in your sequence to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match. If no exact matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences.

Please select locus/scheme Order results by

All loci locus

Enter query sequence (single or multiple contigs up to whole genome in size)

```
ATGTACAACCTTATCGATAAGCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTGT
GGGTGGTGCTGTCTGAATGACTTCGGTTAGTCAGATGATCACTACCCCTTCCAGTA
TCCAGTAGTGGGTATTCAGTTACTTACTATTGTGTGTTGGTCTTTACTGTGAGAAAA
TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCGTTTGCTTGAATAGATTAGCATGGAATAATAATTGAAGGC
TTTCGTGTTTCGATTTGATTGTTTGTTCATGGAAGCAAGGTTAAAAGGAA
```

[Translate query](#)

Closest match: 18S_rRNA_full_length: 2

Tabla 20 Frecuencia de la distribución de subtipos y alelos de las secuencias genéticas de *Blastocystis*

Subtipo	Alelo	Frecuencia (%)
1	88	9/83 (10,8)
	2	2/83 (2,4)
	4	1/83 (1,2)
2	9	15/83 (18,1)
	13	8/83 (9,6)
3	34	29/83 (34,9)
	36	3/83 (3,6)
4	42	16/83 (19,3)

En la tabla 21 se observa la distribución de alelos de las secuencias del ST1, que fueron asignadas a los alelos 88 (75%), alelo 2 (17%) y alelo 4 (8%). En relación al origen geográfico el 33% (4/12) de los pacientes eran españoles, el 25% (3/12) de otros países europeos, el 17% (2/12) de países africanos y asiáticos, respectivamente y el 8% (1/12) de países de América del Sur. El 75% (9/12) correspondió a menores de 16 años. En cuanto al sexo hombres y mujeres tuvieron un porcentaje del 50% (6/12).

Tabla 21 Distribución de alelos de *Blastocystis* sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST1

Nº muestra	Alelo	Subtipo	Origen geográfico	Edad	Sexo
1008	2	1	España	> 16 años	Hombre
1095	88	1	Resto de Europa	> 16 años	Hombre
1137	88	1	España	≤ 16 años	Hombre
1167	88	1	Africa	≤ 16 años	Mujer
1219	88	1	Asia	≤ 16 años	Mujer
1242	4	1	Africa	≤ 16 años	Mujer
1246	2	1	Resto de Europa	≤ 16 años	Mujer
1310	88	1	Africa	≤ 16 años	Hombre
1359	88	1	España	> 16 años	Hombre
1365	88	1	Resto de Europa	≤ 16 años	Mujer
1407	88	1	España	≤ 16 años	Hombre
1424	88	1	Asia	≤ 16 años	Mujer

En la tabla 22 se indica la distribución de los alelos en las secuencias de ST2, asignadas a los alelos 9 (65%) y 13 (35%). En relación al origen geográfico el 43% (10/23) de los pacientes

fueron de España, el 22% (5/23) de otros países europeos, el 26% (6/23) eran de África y el 9% (2/23) de América del Sur. El 57% (13/23) eran varones menores de 16 años.

Tabla 22 Distribución de alelos de *Blastocystis* sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST2

Nº muestra	Alelo	Subtipo	Origen geográfico	Edad	Sexo
1036	9	2	España	≤ 16 años	Mujer
1038	9	2	África	> 16 años	Hombre
1065	9	2	América	> 16 años	Hombre
1111	9	2	América	> 16 años	Mujer
1120	13	2	Resto de España	> 16 años	Mujer
1124	9	2	Resto de España	≤ 16 años	Hombre
1133	9	2	España	≤ 16 años	Mujer
1152	13	2	Resto de España	≤ 16 años	Mujer
1157	9	2	África	> 16 años	Hombre
1166	9	2	España	> 16 años	Mujer
1179	13	2	España	≤ 16 años	Hombre
1195	13	2	Resto de España	≤ 16 años	Hombre
1198	13	2	España	> 16 años	Mujer
1215	9	2	África	≤ 16 años	Hombre
1311	9	2	España	> 16 años	Mujer
1349	9	2	África	> 16 años	Hombre
1354	13	2	África	≤ 16 años	Hombre
1369	13	2	España	≤ 16 años	Mujer
1381	9	2	África	≤ 16 años	Mujer
1383	9	2	España	≤ 16 años	Hombre
1391	9	2	España	≤ 16 años	Hombre
1392	9	2	España	> 16 años	Hombre
1447	13	2	Resto de España	≤ 16 años	Hombre

En la tabla 23 se observa la distribución de los alelos en las secuencias ST3 de *Blastocystis*. La mayoría (91%) fueron asignadas al alelo 34 y el resto (9%) el alelo 36. En relación al origen geográfico el 56% (18/32) de los pacientes eran de España, el 19% (6/32) fueron de otros países europeos y africanos y el 3% (1/32) de América y Asia. El 53% (17/32) fueron menores de 16 años y los hombres y mujeres tuvieron un porcentaje del 50% (16/32) cada uno.

Tabla 23 Distribución de alelos de *Blastocystis* sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST3

Nº muestra	Alelo	Subtipo	País de origen	Edad	Sexo
1069	42	4	España	> 16 años	Hombre
1074	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1158	42	4	España	> 16 años	Hombre
1181	42	4	España	> 16 años	Hombre
1192	42	4	España	> 16 años	Hombre
1205	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1211	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1225	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1250	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1284	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1315	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1316	42	4	España	> 16 años	Mujer
1393	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1398	42	4	España	> 16 años	Mujer
1418	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1419	42	4	España	≤ 16 años	Hombre

La totalidad de secuencias identificadas como ST4 fueron asignadas al alelo 42 (Tabla 24). En relación al origen geográfico, cabe destacar que el 100% (16/16) de los pacientes eran de España. En cuanto a la edad el 63% (10/16) fueron varones menores de 16 años.

Tabla 24 Distribución de alelos de *Blastocystis* sp., país de origen, edad y sexo en las secuencias pertenecientes al ST4

Nº muestra	Alelo	Subtipo	País de origen	Edad	Sexo
1069	42	4	España	> 16 años	Hombre
1074	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1158	42	4	España	> 16 años	Hombre
1181	42	4	España	> 16 años	Hombre
1192	42	4	España	> 16 años	Hombre
1205	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1211	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1225	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1250	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1284	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1315	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1316	42	4	España	> 16 años	Mujer
1393	42	4	España	≤ 16 años	Mujer
1398	42	4	España	> 16 años	Mujer
1418	42	4	España	≤ 16 años	Hombre
1419	42	4	España	≤ 16 años	Hombre

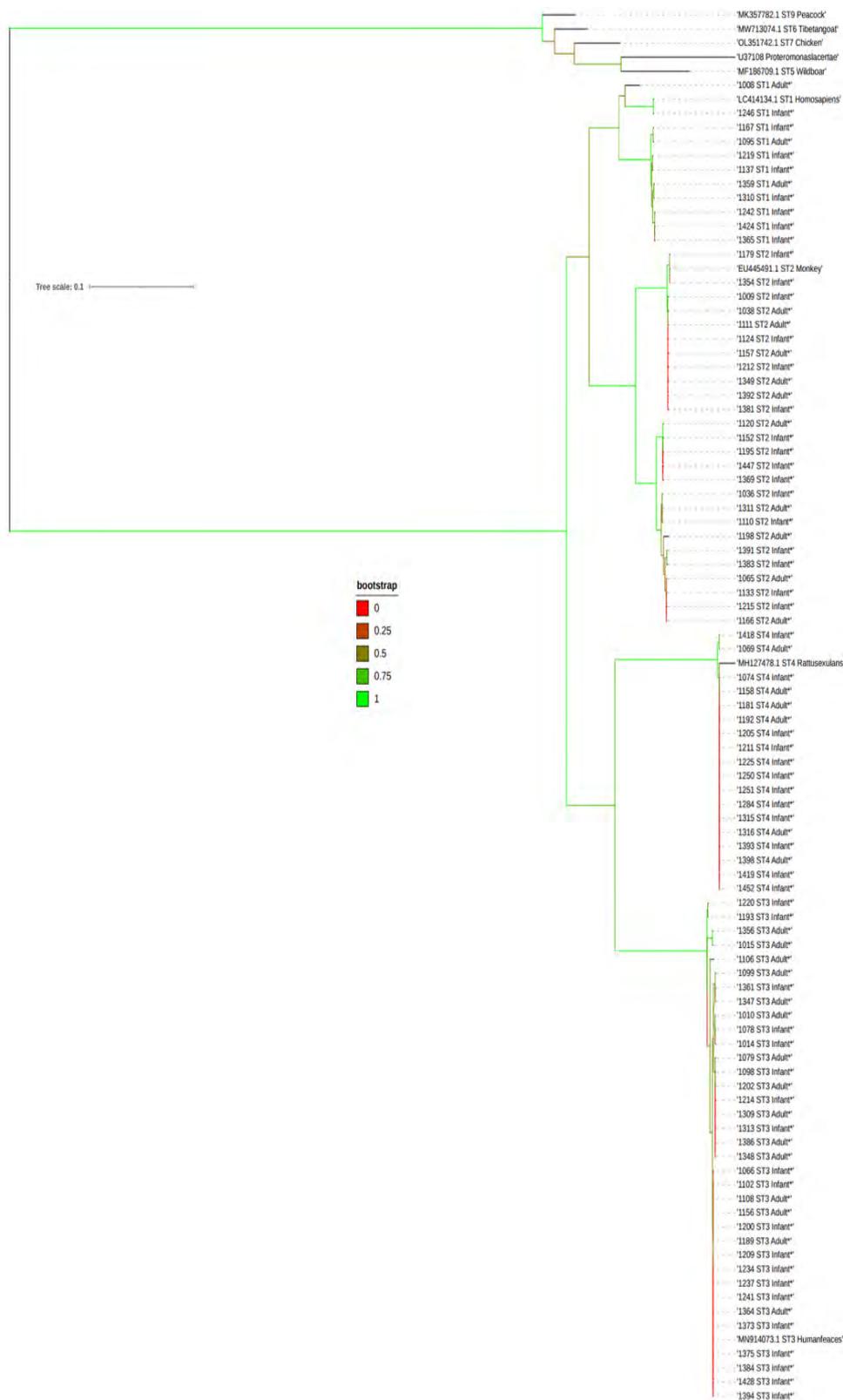
En resumen, el análisis de alelos de las secuencias mostró la diversidad más baja para el subtipo 4, en el que se identificó un único alelo, y la diversidad más alta para ST1. Al analizar la distribución de alelos dentro de cada subtipo en función del país de origen, únicamente se detectaron diferencias significativas en el caso de ST3 (χ^2 de Pearson: 11,075; $p = 0,026$). Para los alelos 36 y 34 de ST3 se encuentran diferencias significativas entre América y España, pero el resto de los orígenes no muestran diferencias entre sí ni con América o España. Cuando se hizo un análisis conjunto para la totalidad de alelos se encontraron diferencias altamente significativas en cuanto a la distribución por origen geográfico (χ^2 de Pearson: 52,245; $p = 0,004$) para el alelo 88 de ST1 entre Asia y España. No se encontraron relaciones significativas entre los subtipos o alelos y edad y sexo de los pacientes.

6.2.5. Análisis filogenético

Las secuencias parciales del gen de la SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. se incluyeron en un archivo de formato FASTA y se alinearon mediante la herramienta de alineación múltiple ClustalW (Thompson et al., 1994) incluida en el paquete de software BioEdit 7 (Hall, 1999). Después de la alineación se incluyeron un total de ochenta y tres secuencias. Como ya se ha indicado, posteriormente se utilizó el paquete de software MEGA 5.10 (Tamura et al., 2011) para obtener mediante Neighbor Joining un árbol filogenético aplicando el algoritmo Kimura 2 con 1000 repeticiones de bootstrap. El archivo de árbol de formato Newick obtenido se utilizó para dibujar los árboles correspondientes mediante la herramienta en línea iTOL v5 (Letunic and Bork, 2021) (<https://itol.embl.de/about.cgi>).

En la figura 17 se presenta un árbol filogenético de manera vertical con *Proteromonas lacertae* (U37108) como outgroup para enraizar el árbol y además se añadió otras secuencias genéticas obtenidas de la base de datos de GenBank® que correspondían a otros subtipos de *Blastocystis* (MF186709.1: ST5, MW713074.1: ST6, OL351742.1: ST7, MK357782.1: ST9). Las ramas bien soportadas por las 1000 repeticiones del bootstrap se observan de color verde que indica un soporte de 1. En el ST1 se observa una subdivisión en dos grupos, quedando separada la secuencia 1008 que es no obstante muy parecida a las restantes. En el caso del ST2 se evidencia una rama bien soportada por el bootstrap con secuencias agrupadas en tres conjuntos y diferencias mínimas entre ellas. Las secuencias de ST3 y ST4 también aparecen claramente separadas en sus correspondientes ramas con poca variabilidad entre ellas.

Figura 17 Análisis filogenético de 83 secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* y secuencias de referencia representativas de distintos subtipos. Se utilizó una secuencia de *Proteromonas lacertae* como outgroup y secuencias de otros subtipos de *Blastocystis* obtenidas de GenBank® (MF186709.1: ST5, MW713074.1: ST6, OL351742.1: ST7, MK357782.1: ST9) El análisis se realizó mediante Neighbor Joining. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el modelo Kimura 2 (imagen propia)



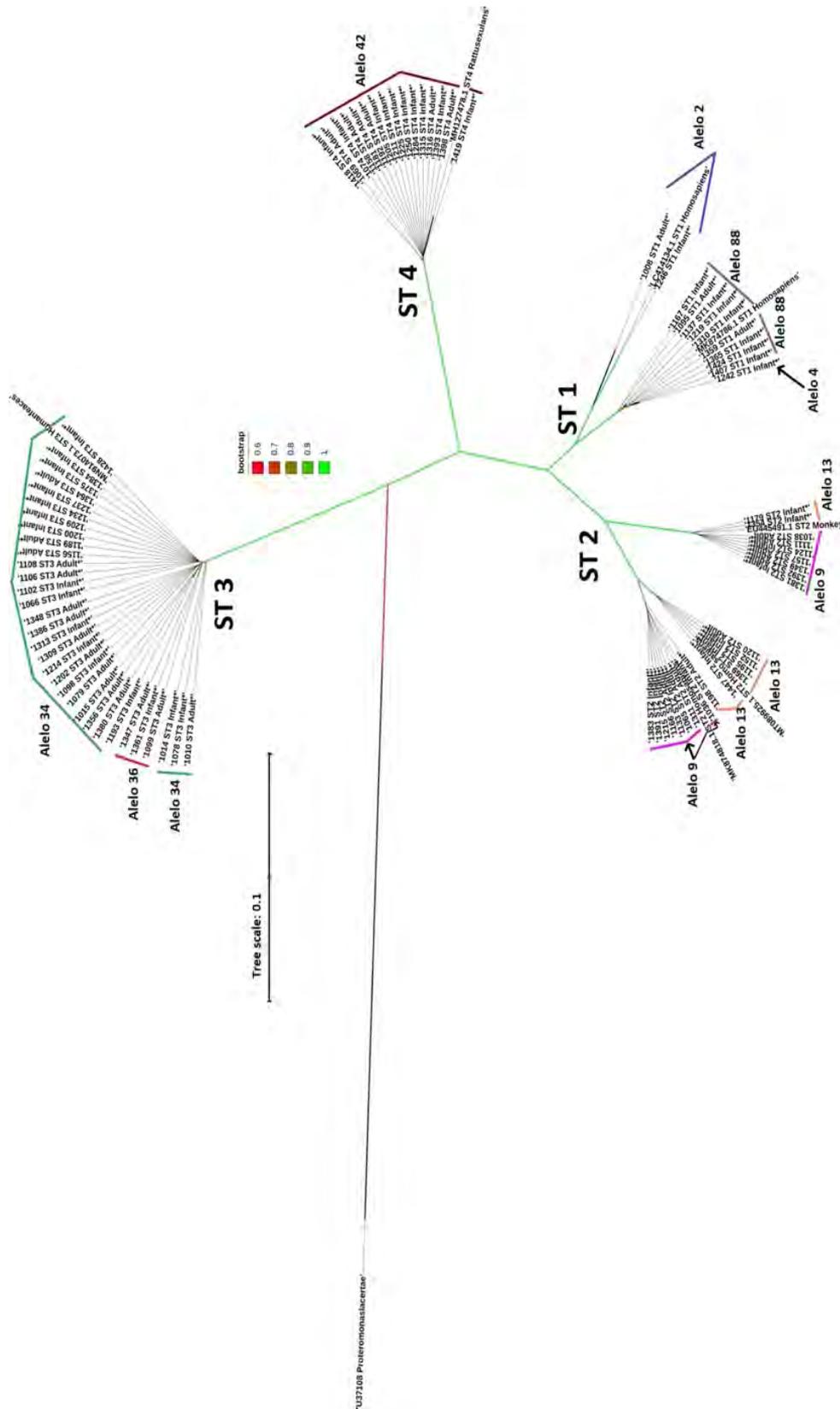
La figura 18 muestra otra representación del árbol obtenido para el gen SSU rARN de *Blastocystis*. Se utilizó a *Proteromonas lacertae* (U37108) como outgroup para enraizar el árbol y se observan cuatro ramas distintas bien soportadas por las 1000 repeticiones del bootstrap donde el color verde que indica un soporte de 1. Además, se añadieron otras secuencias genéticas obtenidas de GenBank® que se usaron como referencia (LC414134.1 y MK874786.1: ST1 *Homo sapiens*, EU445491.1: ST2 Mono, MT089925.1 y MK874818.1: ST2 *Homo sapiens*, MN914073.1: ST3 *Homo sapiens*, y MH127478.1: ST4 *Rattus exulans*.

Se observan en la rama del ST1 dos ramificaciones que están bien apoyadas por las repeticiones de bootstrap y que se señalan con color verde lo cual nos indica un soporte absoluto 1. En el primer grupo se distinguen dos secuencias que presentan el alelo 2, pero en el segundo grupo se observan nueve secuencias que mostraron el alelo 88 y una sola secuencia el alelo 4.

En la rama del ST2 se observan 3 bifurcaciones apoyados por las repeticiones de bootstrap. El primer grupo está formado por siete secuencias que presentan el alelo 9 y solo dos secuencias con el alelo 13. Todas las secuencias del segundo grupo presentan el alelo 13, mientras que todas las del tercer grupo presentaron el alelo 9, excepto una correspondiente al alelo 13. Estos hallazgos evidencian que el método basado en definir alelos no refleja toda la variabilidad existente y de hecho cualquier secuencia que no coincida totalmente con una anteriormente depositada en las bases de datos debería recibir un número de alelo diferente.

El árbol filogenético también confirmó la discriminación de alelos en los subtipos restantes. La rama del ST3 es monofilética, aunque se muestran dos alelos distintos uno de los cuales (34) incluye la mayoría de secuencias y solo tres de ellas corresponden al alelo 36. Por último, la rama del ST4 también es monofilética y el 100% de las secuencias presentaron el alelo 42.

Figura 18 Análisis filogenético de 83 secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* y secuencias de referencia representativas de distintos subtipos. Se utilizó una secuencia de *Proteromonas lacertae* como outgroup y secuencias de otros subtipos de *Blastocystis* obtenidas de GenBank® (LC414134.1 y MK874786.1: ST1 *Homo sapiens*, EU445491.1: ST2 Mono (sic.), MT089925.1 y MK874818.1: ST2 *Homo sapiens*, MIN914073.1: ST3 *Homo sapiens*, MH127478.1: ST4 *Rattus exulans*). En total hubo 352 combinaciones en el conjunto de datos final. El análisis se realizó mediante Neighbor Joining. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el modelo Kimura 2 (imagen propia)



6.2.6. Diversidad genética de las secuencias de *Blastocystis* sp.

La diversidad genética de las secuencias se analizó mediante DnaSP v6 (Rozas et al., 2017). Se identificaron un total de 352 sitios variables y la diversidad de nucleótidos por sitio es $\pi = 0,14808$, mientras que el número promedio de diferencias de nucleótidos entre los haplotipos es $k = 50,05260$. Las 83 muestras dieron como resultado 26 haplotipos diferentes, por lo que el valor del índice de la diversidad de haplotipos conjunta es 0,927. Además, se estudió la diversidad genética de cada uno de los subtipos de *Blastocystis* sp. (Tabla 25).

Tabla 25 Variabilidad genética de subtipos de *Blastocystis* sp. en pacientes del área sanitaria 3 de Zaragoza

Subtipos	Frecuencia	Sitios monomórficos	Sitios polimórficos	h^*	$Hd^\#$	$\pi^\#$
ST1	12	315	30	8	0,924	0,02429
ST2	23	316	28	7	0,842	0,03945
ST3	31	342	7	9	0,774	0,00438
ST4	16	346	1	2	0,233	0,00067
Total	83	234	104	26	0,927	0,14808

h^* : Número de haplotipos, $Hd^\#$: Diversidad de haplotipos, $\pi^\#$: Diversidad de nucleótidos

En conjunto, el número de haplotipos (h) fue de 8, 7, 9 y 2 para ST1, ST2, ST3 y ST4, respectivamente. Además, la diversidad de haplotipos más alta y más baja se observó en ST1 (Hd : 0,924) y ST4 (Hd : 0,233), respectivamente, al igual que los sitios polimórficos (ST1 = 30 y ST4 = 1). Nuestros hallazgos mostraron que ST2 tenía la mayor diversidad de nucleótidos (π : 0,03945), lo que sugiere un alto grado de variabilidad del fragmento amplificado del gen SSU rRNA en este subtipo.

Cuando se analizó la variabilidad genética por subtipos se observaron varias diferencias. En las doce secuencias parciales pertenecientes al ST1 se identificaron 315 sitios monomórficos y 30 polimórficos. La diversidad de nucleótidos por sitio fue de $\pi = 0,02429$. Las doce secuencias dieron como resultado ocho haplotipos diferentes, por lo que el valor del índice de la diversidad de haplotipos es 0,924 (Figura 19).

Se asignaron al ST2 un total de 23 secuencias parciales, identificándose 316 sitios monomórficos y 28 polimórficos. La diversidad de nucleótidos por sitio fue de $\pi = 0,03945$. En

este grupo de secuencias se identificaron siete haplotipos diferentes con una diversidad de 0,842 (Figura 20). En las doce secuencias parciales del ST1 se identificaron 315 sitios monomórficos y 30 sitios polimórficos. La diversidad de nucleótidos por sitio fue de $P_i = 0,02429$. Las doce secuencias dieron como resultado ocho haplotipos diferentes (Figura 19).

Figura 19 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST1. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA (imagen propia)

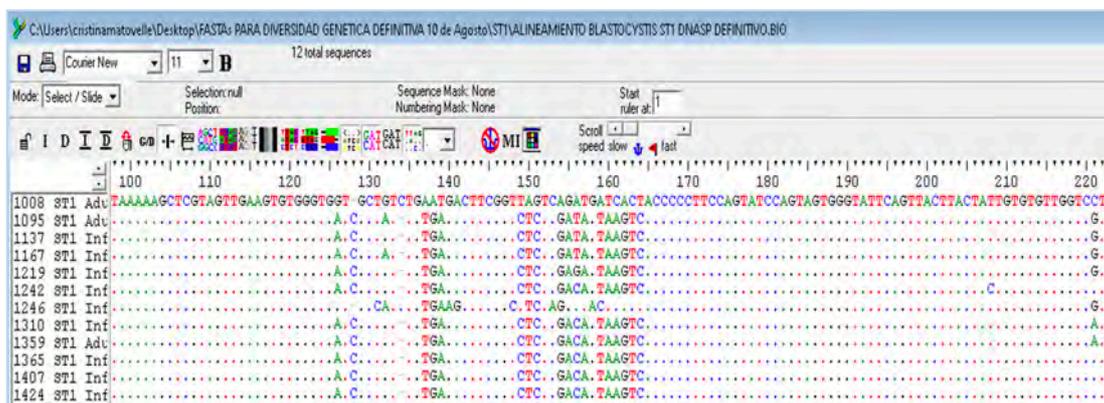
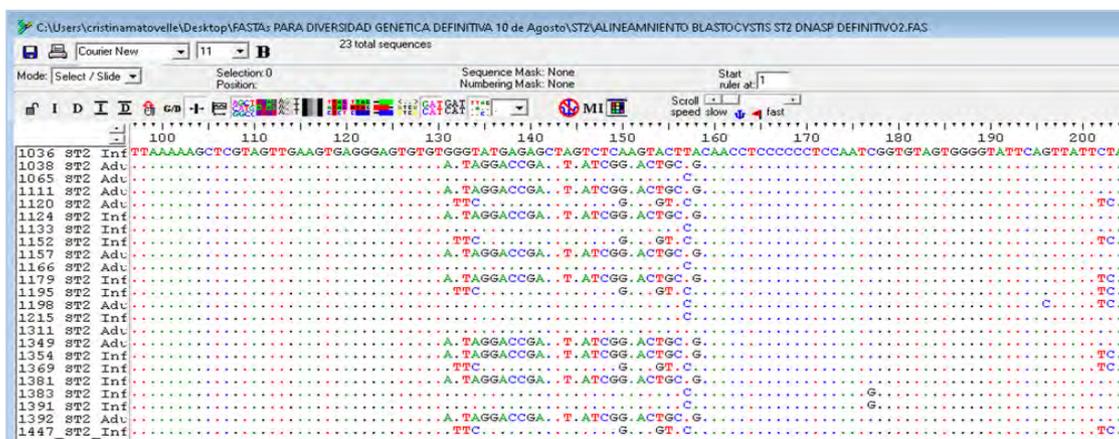


Figura 20 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST2. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA (imagen propia)



En el ST3 estaban asignadas 31 secuencias que mostraron 346 sitios monomórficos y 7 polimórficos. La diversidad de nucleótidos por sitio fue de $P_i = 0,00438$. Las 31 secuencias dieron como resultado 9 haplotipos diferentes y la diversidad de haplotipos fue de 0,774 (Figura 21). Finalmente, al ST4 se adscribieron 16 secuencias parciales, identificándose 346 sitios monomórficos y solo uno polimórfico. Por lo tanto, sólo dos haplotipos se identificaron en las 16 secuencias y la diversidad de nucleótidos por sitio fue en consecuencia muy baja ($P_i = 0,00067$) y la diversidad de haplotipos fue de 0,233 (Figura 22).

Figura 21 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST3. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA (imagen propia)

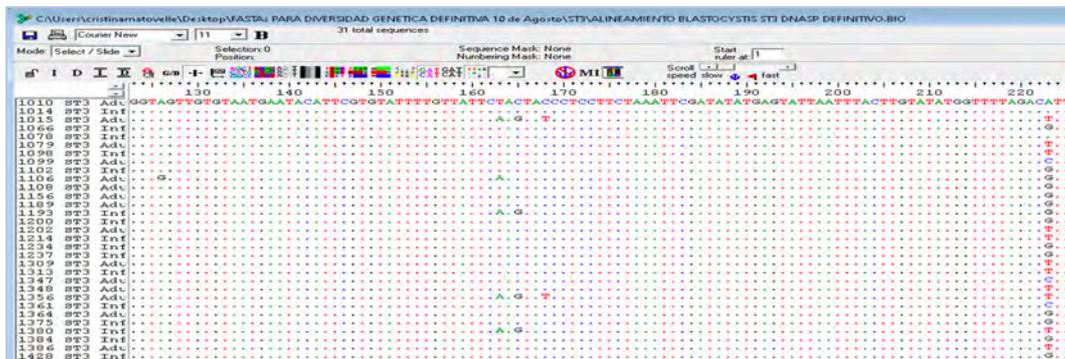
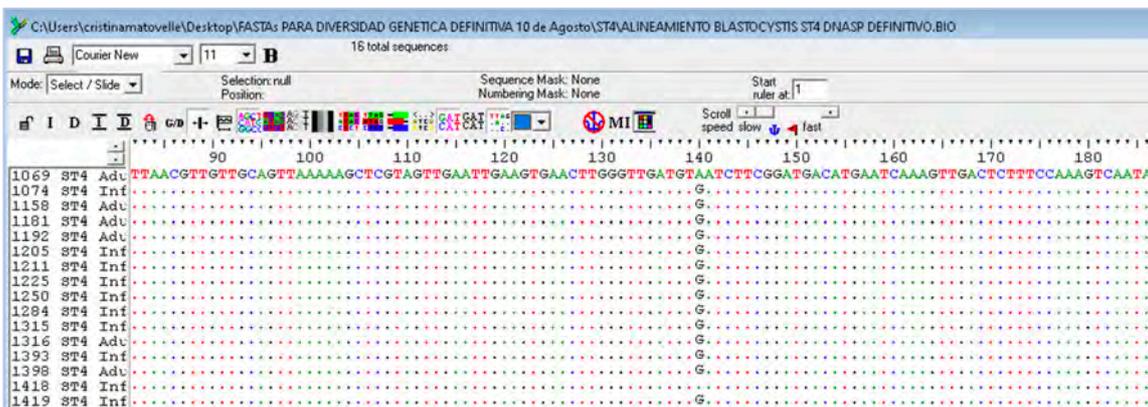


Figura 22 Alineación de secuencias parciales del gen SSU-rRNA de *Blastocystis* sp. de los aislados del ST4. Se muestran las posiciones variables identificadas en el gen SSU-rRNA (imagen propia)



7. DISCUSIÓN

10.1. Epidemiología clínica

Blastocystis sp. es uno de los parásitos más frecuentemente identificados en muestras fecales humanas en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, aunque a diferencia de otros protozoos comunes como *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* sp., que son responsables de una proporción importante de casos de enfermedad diarreica a nivel mundial, la importancia clínica de *Blastocystis* sp. todavía es incierta (Muhsen and Levine, 2012; Checkley et al., 2015; Andersen and Stensvold, 2016). En España, estudios previos en pacientes con trastornos digestivos que acudieron a servicios médicos han demostrado que su prevalencia es dos o incluso hasta diez veces mayor que la de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* sp., respectivamente (González-Moreno et al., 2011); sin embargo, otros estudios han informado que el porcentaje de infección por *Blastocystis* sp. y *G. duodenalis* es muy similar en niños asintomáticos (Reh et al., 2019).

La prevalencia de *Blastocystis* sp. en pacientes con síntomas gastrointestinales en el presente estudio fue 9,2%. Este resultado concuerda con investigaciones previas con microscopía convencional en la zona central de España, donde se han documentado porcentajes de 9,6% en niños VIH positivos y del 5,3-19,4% en niños que asisten a guarderías y escuelas primarias (Martín-Sánchez et al., 1992; Aguila et al., 1997), mientras que la cifra asciende a 13% entre escolares asintomáticos utilizando métodos basados en PCR (Reh et al., 2019). Se han informado valores de prevalencia mayores en pacientes adultos en Cataluña mediante examen microscópico y PCR (27,8 %) (Salvador et al., 2021), porcentaje que se incrementa hasta 35,2 % según un estudio con PCR en humanos que comparten hogares con perros y gatos en el norte de España (Paulos et al., 2018). En Europa, la prevalencia de este protista oscila entre el 3% y 7% en Francia, Italia y Reino Unido usando microscopía óptica, pero se encontraron cifras más altas (14,5 - 24,2 %) en Francia, Holanda y Dinamarca usando métodos basados en PCR (Stensvold et al., 2007; González-Moreno et al., 2011; Masucci et al., 2011; Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Windsor et al., 2002).

De 1996 a 2002 en Aragón, se realizó un estudio epidemiológico donde se identificó 105 casos de cryptosporidiosis. Se observó una mayor prevalencia *Cryptosporidium parvum* (34/105) y *Cryptosporidium hominis* (69/105), sin embargo, en dos pacientes se encontraron *C. meleagridis* y *C. felis*. Además, se describe la distribución de los especies de *Cryptosporidium* en zonas rurales y urbanas donde *C. parvum* resultó ser más frecuente en niños de áreas rurales que áreas urbanas (Llorente et al., 2007). Otro estudio llevado a cabo en el 2008 en Zaragoza

identificaron 108 pacientes con giardiasis donde asociaron la sintomatología de los pacientes con los diferentes ensamblajes de *Giardia duodenalis* (Sahagún et al., 2008). Se observa en estos estudios un número menor de pacientes infectados por *Cryptosporidium* y *Giardia* en relación a los datos obtenidos con *Blastocystis*.

Es importante mencionar que el porcentaje de parasitación detectado en el presente trabajo puede ser una subestimación del valor real, puesto que otras herramientas diagnósticas como los análisis moleculares son mucho más sensibles que la microscopía y el cultivo xénico *in vitro* para detectar *Blastocystis* sp. en muestras fecales de humanos y animales (Stensvold et al., 2007a; Roberts et al., 2011). El cultivo es significativamente más sensible que el examen microscópico, pero su procesamiento es laborioso y no resulta práctico cuando el diagnóstico se requiere de manera urgente (Stensvold et al., 2007a). Se ha señalado que la sensibilidad del diagnóstico microscópico se incrementa conforme lo hace el número de muestras analizadas. Concretamente, algunos autores indican que la combinación de una técnica de concentración partiendo de heces conservadas en SAF (acetato de sodio-ácido acético-formalina) junto con el examen microscópico de muestras múltiples (3 muestras tomadas en días consecutivos) proporciona una sensibilidad similar a la PCR (Van Gool et al., 2003; Bart et al., 2013). Por el contrario, otras publicaciones sugieren que no existen diferencias en la sensibilidad del diagnóstico microscópico cuando se analizan tres muestras de heces tomadas en días consecutivos, en comparación con el examen de una única muestra (Not et al., 2020).

La localización geográfica influye en la prevalencia de las infecciones parasitarias, tal como se observó en un estudio en India entre escolares de enseñanza primaria, donde la prevalencia de *Blastocystis* sp. fue significativamente mayor en los niños de zonas rurales que en los de zonas urbanas (Rayan et al., 2010). En nuestro muestreo, más del 25% de los pacientes infectados procedían de fuera de Europa, siendo el porcentaje de pacientes llegados de América Central y del Sur, y especialmente de África, significativamente mayor en los casos que en los controles. Las deficientes condiciones sanitarias y de higiene pueden justificar la mayor prevalencia de *Blastocystis* sp. en países de bajos ingresos, ya que este microorganismo se transmite principalmente por vía fecal oral y a través del consumo de agua o alimentos contaminados, por lo que su control puede constituir un verdadero reto para las autoridades de salud pública en estos países (Tan, 2008; El Safadi et al., 2014). Así, se han documentado porcentajes de infección que van del 80,4 % al 100 % en escolares de Senegal, 64 % en niños marroquíes, 71,1 % en trabajadores inmigrantes en Qatar, 78 % en la población de Guinea Ecuatorial y 63 % en niños del Líbano (El Fatni et al., 2014; Abu-Madi et al., 2015; El Safadi et al.,

2016; Osman et al., 2016; Khaled et al., 2020; Guilavogui et al., 2022). Este parásito también está presente en países europeos de renta media y alta, aunque las cifras de prevalencia son considerablemente inferiores, como en Dinamarca (5,6 %), Francia (13,7–23,1 %), República Checa (24 %) y España (13 %) (Stensvold et al., 2011; El Safadi et al., 2016; Lhotská et al., 2020; Muadica et al., 2020).

En el presente estudio se ha comprobado que la infección por *Blastocystis* sp. no está asociada con los grupos de edad (niños vs adultos) ni con el sexo, aunque los casos fueron significativamente más jóvenes que los controles cuando se consideró la edad como variable cuantitativa. Muchos estudios en diferentes partes del mundo han investigado la posible relación entre infección por *Blastocystis* sp. y el sexo del hospedador y la mayoría de ellos no han encontrado una asociación estadística (Abu-Madi et al., 2017; Seyer et al., 2017; Lhotská et al., 2020), aunque algunos estudios han demostrado una mayor prevalencia en mujeres (Messaad et al., 2014) y otros en hombres, probablemente por sus actividades al aire libre que pudiera explicar la mayor prevalencia (Abdulsalam et al., 2013b). De igual forma, existen resultados contradictorios en cuanto a la asociación con la edad del individuo. Algunos estudios no encontraron una relación significativa (AbuOdeh et al., 2016; Seyer et al., 2017; Deng et al., 2020), pero otros informaron una mayor tasa de infección por *Blastocystis* sp. en los adultos más jóvenes (El Safadi et al., 2016; Hidalgo et al., 2019), adultos mayores de 18 años (Abdulsalam et al., 2013b) o incluso mayores de 60 años (Li et al., 2007a); No obstante, otros estudios han documentado que los pacientes menores de 30 años o los niños de 5 a 15 años tienen un mayor riesgo de infección por *Blastocystis* sp. (Paulos et al., 2018; Guilavogui et al., 2022). En definitiva, se puede concluir que no existe consenso en la posible asociación entre presencia de este microorganismo y variables como la edad y sexo.

Nuestros resultados revelan una diferencia altamente significativa con respecto al IMC, siendo los individuos con bajo peso significativamente más comunes entre los casos que en los controles. Este hallazgo es coherente con estudios anteriores que concluyen una correlación positiva entre IMC bajo e infección por *Blastocystis* sp., una observación que se ha relacionado con un posible efecto negativo del protista sobre la ingesta dietética y el metabolismo energético (Andersen and Stensvold, 2016; Beghini et al., 2017; Mirjalali et al., 2020). Asimismo, Malatyali et al., (2021) realizaron un estudio transversal y encontraron una asociación inversa entre la infección por *Blastocystis* sp. y la obesidad. Este posible impacto negativo en el peso del hospedador podría ser relevante si se tiene en cuenta que algunos individuos pueden permanecer infectados durante periodos de hasta 10 años (Scanlan et al., 2014).

Otro factor potencial que determina la transmisión de patógenos es la inmunidad del hospedador, ya que es bien conocido que los pacientes con inmunidad baja son particularmente receptivos a las infecciones oportunistas (Klustersky y Aoun, 2004). *Blastocystis* sp. infecta tanto a individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos, pero su posible papel patógeno u oportunista aún no ha sido claramente definido. Revisiones sistemáticas y metaanálisis recientes han estimado que la tasa de prevalencia global de este protista en pacientes inmunocomprometidos es de alrededor del 10% (Khorshidvand et al., 2021) y los estudios de casos y controles han demostrado que los estados de inmunodepresión, como los padecidos por enfermos de cáncer o los sometidos a trasplante de órganos o hemodiálisis están asociados con mayores probabilidades de infección (A. M. Mohamed et al., 2017). Por el contrario, algunos estudios señalan una prevalencia similar o incluso menor en pacientes inmunodeficientes en comparación con los controles (Hidalgo et al., 2019).

En el presente estudio, los tratamientos inmunosupresores con quimioterapia, anticuerpos monoclonales o fármacos antirretrovirales fueron más frecuentes en los casos que en los controles, lo que podría respaldar la hipótesis de que *Blastocystis* sp. es un organismo oportunista. Sin embargo, cabe destacar que el tratamiento con corticoides fue mucho más frecuente en controles que en los casos (28,9% frente a 0,9%), y que el uso de estos fármacos protege significativamente frente a esta parasitación, de acuerdo con los resultados obtenidos por regresión logística binaria. Se desconoce la explicación de este hallazgo; de hecho, un estudio reciente en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria no mostró una asociación clara entre la presencia de *Blastocystis* sp. y el uso de corticoides (Azimirad et al., 2021).

Nuestros resultados indican que la diabetes tipo 2 fue significativamente más frecuente en los casos y que esta enfermedad metabólica también fue un factor significativo en el análisis de regresión logística binaria. Estudios previos señalan una mayor frecuencia de protozoosis y helmintosis en pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con los afectados por diabetes tipo 1 (Machado et al., 2018). La mayoría de los estudios también indican que los pacientes con diabetes mellitus tienen un mayor riesgo de infección por *Blastocystis* sp., lo que se ha relacionado con un sistema inmunitario debilitado (Popruk et al., 2020). De hecho, según un estudio realizado en Egipto, la presencia de diabetes mellitus incrementa el riesgo de infección por *Blastocystis* sp. hasta más de 9 veces en pacientes con síndrome de intestino irritable (SII) (Ibrahim et al., 2020), aunque estudios previos en España no encontraron correlación entre estos factores (Hidalgo et al., 2019). Por el contrario, nuestros hallazgos no respaldan una asociación entre infección por *Blastocystis* y SII, síndrome que fue incluso más común entre los

controles que entre los casos. La implicación de *Blastocystis* sp. En el desarrollo del SII está todavía en duda, aunque algunos estudios han indicado una asociación positiva y sugieren que el diagnóstico de este protista debería incluirse en el protocolo clínico de pacientes con SII (Rostami et al., 2017).

La razón de probabilidades (odds ratio u OR en inglés) para variables como la presencia de halitosis, bacterias patógenas y eosinofilia relativa muestra valores muy elevados y confirma que todas ellas están asociadas con la infección por *Blastocystis* sp. No obstante, los amplios intervalos de confianza obtenidos sugieren que estos valores de OR pueden estar sobreestimados, debido a las bajas frecuencias de estos resultados en toda la muestra de casos y controles.

En nuestro estudio también se observa una estrecha asociación entre eosinofilia relativa e infección por *Blastocystis* sp. Cabe destacar que la eosinofilia suele estar asociada a las infecciones por helmintos, especialmente coincidiendo con la migración de las larvas a través de los tejidos, y por ello se describen altas tasas de eosinofilia entre los viajeros/inmigrantes procedentes de países con recursos limitados y de zonas tropicales, que son los más propensos a adquirir estas infestaciones. En la práctica clínica, el manejo de pacientes con niveles elevados de eosinofilia dependerá de sus antecedentes de viaje, de sus condiciones médicas y de los signos y síntomas clínicos apreciados, si bien siempre se deben considerar posibles helmintosis al plantear el diagnóstico diferencial en pacientes procedentes de zonas tropicales (Carranza-Rodriguez et al., 2008). Sin embargo, la mayoría de autores no relaciona la presencia de eosinofilia con las infecciones por protozoos y son muy pocos los estudios que la asocian con la parasitación por *Blastocystis* sp., aunque los hallazgos del presente trabajo claramente evidencian que los pacientes con eosinofilia relativa tienen más probabilidades de estar infectados (Sheehan et al., 1986; O'Connell and Nutman, 2015).

Un factor que se considera decisivo en la presencia y patogenicidad de *Blastocystis* sp. es la composición de la microbiota intestinal, hasta el punto de sugerir que la alteración del entorno intestinal que producen los patógenos estaría implicada en su patogenicidad (Wawrzyniak et al., 2013). En niños sanos, Kodio et al., (2019) concluyeron que la colonización de *Blastocystis* sp. se asocia con una mayor diversidad de comunidades bacterianas en el intestino, pero no se asocia con la presencia de bacterias potencialmente patógenas. Dado que una mayor diversidad bacteriana se asocia comúnmente con la salud y una menor incidencia de

enfermedades inflamatorias, se ha sugerido que la colonización de *Blastocystis* se asocia con un microbioma intestinal saludable (Deng et al., 2021).

El análisis de agrupamientos en el presente estudio revela que este protista es con diferencia el parásito intestinal más frecuentemente detectado, no observándose otros protozoos o helmintos entéricos en la mayoría de los pacientes infectados; sin embargo, las co-infecciones con bacterias patógenas o parásitos entéricos fueron mucho más frecuentes entre los casos que entre los controles, lo que sugiere que estarían asociadas a la presencia de *Blastocystis* sp. Numerosos estudios señalan co-infecciones entre *Blastocystis* sp. y bacterias u otros parásitos (Salvador et al., 2016; Dacal et al., 2018; Salazar-Sánchez et al., 2021). Nuestros hallazgos contrastan con las observaciones de Hidalgo et al., (2019) quienes sugieren que la presencia de otros parásitos disminuye significativamente el riesgo de detección positiva de *Blastocystis* sp., aunque los mismos autores indicaron un posible sesgo en sus resultados, ya que sólo incluyeron pacientes con muestras remitidas para diagnóstico parasitológico.

El carácter patógeno o comensal de *Blastocystis* sp. en el intestino humano continúa siendo un aspecto controvertido. Algunos estudios en individuos sanos con muestras aleatorias han demostrado una elevada presencia de *Blastocystis* sp. y una colonización mantenida del intestino, pero otros lo han implicado en el origen de enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome del intestino irritable (SII) e incluso trastornos cutáneos. Los síntomas intestinales más comunes atribuidos a la infección por *Blastocystis* sp. son diarrea y dolor abdominal, así como síntomas inespecíficos, como náuseas, vómitos, fatiga y flatulencia (Stensvold et al., 2009; El Safadi et al., 2016; Beghini et al., 2017; Khorshidvand et al., 2021). No obstante, otros estudios no encontraron una asociación significativa entre la infección por *Blastocystis* sp. y la presencia de síntomas gastrointestinales (Leder et al., 2005; Robles-Cabrera et al., 2021).

Nuestros resultados apuntarían a un papel potencialmente patógeno de este protista, ya que la mayoría de los síntomas referidos por los pacientes infectados fueron significativamente más comunes en los casos que en los controles, incluyendo náuseas, aerofagia, urticaria, picor anal y dispepsia; análogamente, la presencia de dolor abdominal, anorexia y halitosis incrementaría la probabilidad de padecer una infección por *Blastocystis* según este trabajo. Por el contrario, otros síntomas como diarrea y fiebre fueron más frecuentes en el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas en el caso de la fiebre. La ausencia de pacientes control carentes de síntomas gastrointestinales constituye una limitación

del presente trabajo y no permite obtener conclusiones definitivas sobre el poder patógeno potencial de *Blastocystis* sp. El origen de esta circunstancia reside en las características de nuestro Sistema Nacional de Salud, donde únicamente se analizaron muestras de pacientes que habían acudido a la consulta médica por la presencia de algunos de los síntomas anteriormente mencionados.

Conviene recordar que en la práctica clínica diaria en países desarrollados se tiene la falsa percepción que las parasitosis se han erradicado tanto en adultos como en niños, por lo que no se incluyen en los diagnósticos diferenciales primarios de pacientes con síntomas gastrointestinales agudos o crónicos. A menudo, no se descartan estas enfermedades olvidando que pueden estar en el origen de cuadros de anemia crónica, desnutrición, malabsorción, retraso del crecimiento, deterioro cognitivo y retraso del crecimiento (Oliveira et al., 2015; Berkman et al., 2002). Además, se sabe que el poliparasitismo exagera los síntomas en los pacientes infectados. Sin embargo, a pesar de su impacto socioeconómico y en Salud Pública, la epidemiología de las enfermedades parasitarias y las co-infecciones sigue siendo poco conocida en muchas regiones del mundo (Wang et al., 2016).

En conclusión, los resultados de la epidemiología clínica revelan una elevada prevalencia de infección por *Blastocystis* sp. en individuos con síntomas gastrointestinales en nuestra zona geográfica, siendo destacable la ausencia de parásitos en la mayoría de los pacientes infectados. La probabilidad de estar infectado por *Blastocystis* sp. aumentó significativamente en los individuos de bajo peso y en los procedentes de América Central y del Sur, y especialmente de África. Asimismo, se pudo constatar que la presencia de eosinofilia relativa y determinados síntomas gastrointestinales están asociados con la infección por *Blastocystis* sp., especialmente dolor abdominal, anorexia y halitosis, circunstancia que no se observa en otros síntomas como diarrea o fiebre. Las co-infecciones con bacterias patógenas también se relacionaron con la presencia de *Blastocystis* sp. Una mayor proporción de pacientes infectados por *Blastocystis* sp. tenía diabetes de tipo 2 y recibía determinados tratamientos inmunosupresores, como quimioterapia, anticuerpos monoclonales o fármacos antirretrovirales, lo que sugiere el papel de *Blastocystis* sp. como organismo oportunista. Finalmente, cabe destacar que este es el primer estudio de casos y controles de *Blastocystis* sp. en humanos en el área sanitaria 3 de Zaragoza-España.

10.2. Epidemiología molecular

La distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. presenta variaciones en función de los países y continentes (Stensvold et al., 2009a). En este trabajo de investigación se ha realizado una revisión de la bibliografía científica sobre los estudios moleculares realizados durante el presente milenio, para identificar las variantes de *Blastocystis* sp. que infectan a humanos en todo el mundo y los hallazgos se recogen en el Anexo 8. Cabe destacar que no en todos ellos se ha utilizado la misma metodología, por lo que los resultados no son siempre directamente comparables. Esta circunstancia no es ajena a las investigaciones realizadas en nuestro país entre 2009 y 2023, donde la distribución de subtipos identificados se indica en la Tabla 5 y Anexo 9. En todos ellos, con excepción del estudio realizado en Leganés, se subtiparon entre 26 y 51 muestras, cifra considerablemente inferior a la analizada en el presente trabajo (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023). En cualquier caso, se debe tener en cuenta que el protocolo utilizado por nosotros, propuesto por Santín et al. (2011) y basado en la amplificación por PCR de un fragmento (479) pb del gen SSU-rRNA de *Blastocystis*, ha sido ampliamente utilizado en la literatura especializada.

En el Anexo 8 se evidencia que la mayoría de infecciones humanas en todo el mundo son atribuibles al subtipo ST3. Esta variante es claramente mayoritaria según estudios en Alemania, Reino Unido, Dinamarca, Grecia, Francia, Italia, Suecia, Países Bajos o Polonia (Böhm-Gloneg et al., 1997; Clark, 1997; Stensvold et al., 2006; Menounos et al., 2008; Souppart et al., 2009; Meloni et al., 2011; Forsell et al., 2012; Bart et al., 2013; Rudzińska et al., 2019). Asimismo, es la variante más prevalente en la mayoría de países de América, Asia o África donde se han realizado estudios moleculares, aunque las diferencias con otras variantes (ST1) no son tan evidentes en Australia.

Sin embargo, la superior prevalencia del subtipo ST3 de *Blastocystis* no es tan evidente en los estudios realizados en España. De hecho, dicho subtipo no fue identificado en un estudio realizado en Valencia sobre individuos sintomáticos, incluyendo niños y adultos y mientras que fue la segunda variante más frecuente en Álava, según un estudio molecular realizado sobre mascotas (perros y gatos) y sus dueños, incluyendo niños y adultos asintomáticos (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018). Este subtipo fue incluso menos frecuente en dos investigaciones realizadas en la comunidad de Madrid, concretamente en los municipios de Leganés y Majadahonda, donde ST3 se sitúa en el tercer puesto por orden de frecuencia

(Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023). En el presente estudio, realizado en una zona geográfica ubicada en el noreste de España, la variante ST3 se incluyó entre las más prevalentes, con un porcentaje similar al de pacientes infectados por ST2. Esta misma situación se repite en las otras dos variantes minoritarias (ST1 y ST4) que fueron identificadas en el mismo número de individuos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el subtipo ST2 fue identificado en el mismo número de individuos que ST3 en el presente trabajo, hallazgo que marca una importante diferencia con respecto a otros estudios. En Europa, únicamente un estudio realizado en 2008 en Irlanda (Scanlan y Marchesi, 2008) señala esta variante como el más prevalente, mientras que en otros países (Alemania, Reino Unido, Grecia, Francia, Dinamarca, Suecia) lo sitúan como tercero o cuarto por orden de frecuencia (Böhm-Gloning et al., 1997; Clark, 1997; Stensvold et al., 2006; Menounos et al., 2008; Souppart et al., 2009; Meloni et al., 2011; Forsell et al., 2012; Bart et al., 2013; Rudzińska et al., 2019). Por el contrario, ST2 se encuentra entre los más prevalentes, junto con ST1, en países de clima cálido, como Senegal, Líbano, Arabia Saudita o Bolivia, lo que indicaría una cierta adaptación a estos ambientes (Scanlan y Marchesi, 2008; El Safadi et al., 2013; Ramírez et al., 2016; A. M. Mohamed et al., 2017; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Khaled et al., 2021). No obstante, investigadores como Jiménez et al., (2019) evidencian que la mayor frecuencia de ambas variantes en América del Sur estaría relacionada con los altos índices de pobreza, saneamiento inadecuado, conflictos civiles internos, alta biodiversidad y falta de agua potable, condiciones que en definitiva facilitan la transmisión *Blastocystis* sp.

Los pacientes pediátricos podrían ser el factor común que explica la alta frecuencia de ST2 en nuestro país. Según el trabajo realizado en Álava por Paulos et al., (2018) fueron los niños de edades comprendidas entre 5 y 15 años los mayormente infectados por este subtipo, hallazgo semejante al observado en Leganés, donde se analizaron niños en edad escolar asintomáticos y menores de 14 años, o el trabajo llevado a cabo en Majadahonda, donde se investigaron niños de 4 a 42 meses que acudían a guarderías públicas, siendo destacable el hecho de que la práctica totalidad de positivos a *Blastocystis* (25/26) no padecían diarrea ni otros síntomas gastrointestinales y de nuevo fue el subtipo ST2 el más prevalente (Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023). En nuestro estudio, más del 60% de los pacientes infectados por el ST2 (37/59) fueron niños menores de 16 años afectados por algún síntoma gastrointestinal como dolor abdominal o diarrea. El subtipo ST2 fue por el contrario claramente minoritario en Valencia, donde la mayoría de los individuos analizados eran adultos (Domínguez-Márquez et

al., 2009). Estos hallazgos sugieren que la transmisión de esta variante podría ser a través de un ciclo de transmisión humana a través de la vía fecal-oral típica de menores en edad escolar (El Safadi et al., 2014).

El subtipo ST4 fue identificado en algo más del 15% de los pacientes por lo que se puede considerar una variante minoritaria en la zona de estudio. En Europa, únicamente algunos estudios en Dinamarca y Francia lo sitúan como el más prevalente, mientras que otros estudios en estos mismos países o Reino Unido y Suecia lo identifican como el segundo más prevalente (Stensvold et al., 2006; Scicluna et al., 2006; Poirier et al., 2011; Forsell et al., 2012). No obstante, su presencia parece estar limitada a los países templados de Europa, con excepción de algunos estudios en Japón (Kaneda et al., 2001), Malasia (Noradilah et al., 2017a) y China (Li et al., 2007b), mientras que sería muy poco frecuente en otros continentes, siendo numerosas las investigaciones en países de Latinoamérica, Asia o África donde esta variante ni siquiera se detecta.

En España, la elevada frecuencia de ST4 se evidencia en el trabajo realizado en Valencia, donde más del 94% de los pacientes infectados por *Blastocystis* sp. albergaban este subtipo. Es importante mencionar que la mayoría de pacientes en este caso tenían diarrea aguda, circunstancia que coincide con las observaciones de un estudio danés donde el 74 % de los pacientes con diarrea aguda infectados con *Blastocystis* presentaron ST4 (Stensvold et al., 2011a). Esta variante fue sin embargo claramente minoritaria en los estudios de Álava o Leganés, mientras que se sitúa en segundo lugar por orden de frecuencia en Majadahonda (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023). Análogamente, la frecuencia relativa de ST4 parece superar la del ST1 y ST3 en pacientes con diarrea en entornos hospitalarios en España (Köster et al., 2019).

Cabe destacar que ST4 es raro en aquellos estudios donde ST1 es el más frecuente y especialmente en países subtropicales y/o con poblaciones mayoritariamente musulmanas, lo que pudiera indicar que los estilos de vida y cierta alimentación podrían estar más vinculadas con la distribución de variantes de este parásito (Motazedian et al., 2008; Eroglu et al., 2009). Algunos autores sugieren que ST4 podría ser más patógeno que otros subtipos de *Blastocystis* sp. Según Stensvold (2012), esta mayor virulencia podría deberse a que la infección en humanos procede del contacto con roedores silvestres infectados por este subtipo, lo que supone un evento evolutivo importante derivado de una menor adaptación de los humanos a esta variante.

No obstante, estas consideraciones deben tomarse con precaución ya que otras investigaciones no han demostrado una mayor patogenicidad de ST4 (Meloni et al., 2011; Seyer et al., 2017). Otros grupos de investigación han propuesto un vínculo entre ST1 y la etiología del síndrome de intestino irritable (Fouad et al., 2011), o entre ST3 y trastornos gastrointestinales, incluida la diarrea (Tan et al., 2008).

Al igual que se ha señalado anteriormente para ST4, la prevalencia del subtipo ST1 en este estudio fue ligeramente superior al 15%, por lo que también podría considerarse como una variante minoritaria en la zona de estudio. Su presencia en otros países europeos tampoco se puede considerar predominante, aunque algunos estudios en Alemania, Grecia, Francia, Dinamarca o Italia lo señalan como el segundo subtipo más frecuente (Bohm-Gloning et al., 1997; Menounos et al., 2008; Souppart et al., 2009; Rene et al., 2009; Gabrielli et al., 2020). La situación es diferente en otros continentes, ya que ST1 fue el subtipo más común en Colombia, Brasil, Libia, Nigeria, Tanzania, Irán, Turquía, Arabia Saudita, Filipinas o Australia (Rivera and Tan, 2005; Eroglu et al., 2009; Malheiros et al., 2011; Santín et al., 2011; Nagel et al., 2012; Alfellani et al., 2013c; Wakid et al., 2022). El carácter minoritario de este subtipo también se refleja en los otros estudios realizados en nuestro país, con excepción de Leganés donde es el segundo más frecuentemente identificado (Muadica et al., 2020).

Un análisis conjunto de estos datos revela que la distribución de subtipos de *Blastocystis* en la población del área de Salud 3 de Zaragoza presenta importantes variaciones con respecto a otras zonas geográficas, incluyendo nuestro propio país. Esto podría deberse a que un porcentaje mayoritario de los pacientes analizados (42%) eran inmigrantes residentes pero procedentes de diferentes continentes, por lo que diversos factores considerados de riesgo en los países de origen, como potabilización del agua de bebida, contacto con el ganado o con otras personas que sufrían episodios de diarrea, mostrarían una realidad muy diferente a las conclusiones de otros estudios llevados a cabo en España. Se podría incluso pensar que parte de estos pacientes eran ya portadores de cepas de *Blastocystis* sp. antes de su llegada a España, presentando por tanto las variantes más frecuentes en sus respectivos países de origen. Estos hallazgos también demuestran la importancia de los estudios moleculares para conocer la diversidad genética de *Blastocystis* sp. a nivel global. En este sentido, existen importantes lagunas sobre su variabilidad genética en países de Centro y Sudamérica, África, Medio oriente y Asia.

Otro aspecto relevante que se deriva del presente trabajo son las infecciones mixtas por diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. en un mismo hospedador, hallazgo que según se describe en el Anexo 8 evidencian diversos estudios en todo el mundo, aunque ninguno de los trabajos españoles previos informa de la presencia de estas co-infecciones (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023). Un estudio realizado en Francia investigó explícitamente infecciones mixtas de *Blastocystis* en humanos mediante clonación de productos de PCR. La técnica permitió identificar tres subtipos en un mismo hospedador (ST2, ST3 y ST4), aunque su aplicación con grandes cohortes de individuos está limitada por su laboriosidad y coste prohibitivo (Meloni et al., 2012).

Además de la técnica anterior, han sido varios los protocolos utilizados para la detección de infecciones mixtas durante las últimas décadas, generalmente partiendo de ADN extraído de cultivos *in vitro* o directamente de materia fecal. Tal como se ha realizado en el presente trabajo, en muchos estudios se ha empleado la secuenciación por Sanger de productos del gen 18S rRNA amplificados por PCR con cebadores universales y/o específicos de *Blastocystis*, siendo la presencia de picos solapados en el cromatograma lo que evidencia una infección mixta (Scicluna et al., 2006; Stensvold, 2013b). Dado que la técnica de PCR suele amplificar preferentemente el ADN del subtipo más abundante en la mezcla, sólo cuando ambos subtipos se encuentran en similar concentración se amplificarían con similar eficacia y por tanto proporcionan picos dobles en el cromatograma (Maloney et al., 2019).

Otras técnicas han utilizado cebadores específicos de subtipo para identificar co-infecciones, aunque estudios recientes indican que dan resultados inconsistentes (Scanlan, 2012; Stensvold, 2013a). Scanlan et al., (2015) propusieron un novedoso protocolo con esta técnica que detectó un 22% (11/50) de infecciones mixtas que no habían sido identificadas con los métodos convencionales (Scanlan et al., 2014). Diez de los pacientes albergaban infecciones dobles y un paciente una co-infección por tres subtipos.

Las modernas técnicas de secuenciación de nueva generación (en inglés “Next-Generation Sequencing”) también han sido utilizadas recientemente para identificar infecciones mixtas por *Blastocystis* spp., permitiendo además cuantificar de forma fiable la proporción de copias de cada una de las variantes presentes en la muestra, incluso si se encuentran en muy baja proporción (hasta el 5%). Esta técnica usa plataformas miniaturizadas y paralelizadas para secuenciar de 1 millón a 43 mil millones de lecturas cortas (50 a 400 bases cada uno) por cada operación del instrumento, con lo cual pueden identificar infecciones mixtas de *Blastocystis* con

mayor precisión. Su uso está limitado por el alto coste y requerimiento de personal altamente cualificado, aunque proporciona información más precisa sobre las infecciones mixtas que permitirá resolver muchas hipótesis sobre *Blastocystis* en el campo de la investigación (Maloney et al., 2019b).

La mayoría de estudios que detectan infecciones mixtas lo describen como un hallazgo ocasional, aunque teniendo en cuenta la ubicuidad de *Blastocystis* sp. es muy probable que su frecuencia sea muy superior a lo que se indica en las publicaciones debido a las limitaciones de las técnicas utilizadas para su detección. En un meta-análisis de la distribución de variantes de *Blastocystis* en humanos se encontró que menos de la mitad de publicaciones (24/55) informaban de infecciones mixtas, cuya prevalencia se cifra en torno al 6% (Alfellani et al., 2013c). Este dato coincide casi plenamente con los hallazgos del actual trabajo, ya que en nuestro caso las identificamos en 11 de las 173 muestras subtipadas (6,3%) por la presencia de picos dobles en el cromatograma, de las cuales cuatro corresponden a ST1 y siete a ST2.

En este sentido, un hallazgo a tener en cuenta en nuestro estudio es la detección de distintos subtipos en muestras repetidas del mismo paciente (Tabla 15). Esta circunstancia se evidenció en 4 individuos, habiendo transcurrido un lapso de entre 1 y 9 días de diferencia entre la primera y la última muestra. Teniendo en cuenta que la PCR amplifica preferencialmente el subtipo más abundante, no se puede saber con certeza si en ellos ya coexistían los diferentes subtipos desde la primera muestra y no fueron correctamente detectados por limitaciones técnicas. De hecho, en uno de los pacientes se analizaron 3 muestras y el subtipo identificado en la primera y última fue el mismo. Otra alternativa que podría explicar este hallazgo es que los pacientes se reinfectaran con otra cepa, algo no obstante difícil de justificar en uno de ellos donde únicamente transcurrió 1 día entre la primera y última muestra. Dos de estos cuatro pacientes eran inmigrantes, ambos niños y procedentes de Ucrania y Gambia, respectivamente. Por otra parte, destaca que en tres de estos individuos se identificó el subtipo ST1, minoritario en nuestro caso, pero que según Scanlan et al., (2015) suele estar presente en infecciones mixtas.

En los Anexos 4 a 7 se recoge la comparación de secuencias de *Blastocystis* sp. de los distintos subtipos identificados en este estudio y otras secuencias depositadas en GenBank®, tanto de origen humano como de animales e incluso de origen ambiental, obtenidas en España y otros países. El análisis de las Tablas revela una homología elevada en muchos casos, siendo destacable que la homología en muchas de nuestras secuencias fue del 100% con aislados de

origen animal (*Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus*), mientras que similitud fue inferior al comparar con cepas de origen humano, lo cual apoyaría el carácter potencialmente zoonótico de algunas de estas variantes.

Concretamente, las secuencias del ST1 son muy similares a las de *Homo sapiens* distribuidas en Colombia, México, Laos y Malasia (Rojas-Velázquez et al., 2019; Santín et al., 2011). También se observó una elevada homología con secuencias ST1 de animales en EEUU (ganado vacuno – *Bos taurus*), España (lémur dorado – *Haplorhina leuciscus*), Alemania (cerdo – *Sus scrofa domesticus*) Japón (cerdo – *Sus scrofa domesticus*, pollo – *Gallus gallus* y el orangután de Borneo – *Pongo pygmaeus*), China (mono rhesus – *Macaca rhesus*, cerdo – *Sus scrofa domesticus*, oso panda – *Ailuropoda melanoleuca* y león blanco – *Phantera leo*) (Arisue et al., 2003; Abe, 2004; Santín et al., 2011; Maloney et al., 2019). En Filipinas y Polonia se encontraron secuencias del ST1 similares a las obtenidas en este trabajo, que procedían de aguas residuales y de agua de laguna, respectivamente (Banaticla and Rivera, 2011) (Anexo 4).

Las secuencias del ST2 del presente estudio también presentaron un alto porcentaje de similitud con secuencias depositadas en GenBank® de humanos en Colombia, Brasil, México, Países Bajos, Dinamarca, Turquía, Libia, Corea del Sur (Stensvold et al., 2007c; Santín et al., 2011; Abdulsalam et al., 2013a; Bart et al., 2013; Barbosa et al., 2018; Rojas-Velázquez et al., 2019; Kim et al., 2020; Sarzhanov et al., 2021), así como diversas especies animales en Alemania (cerdo – *Sus scrofa domesticus*), España (zorro rojo – *Vulpes vulpes* y cercopiteco de cara de búho – *Cercopithecus hamlyni*), China (Mono rhesus – *Macaca mulata*) e Irán (perro – *Canis lupus familiaris*) (Calero-Bernal et al., 2020; Mahdavi et al., 2022; Santín et al., 2011; Wylezich et al., 2019; Zhao et al., 2017). Asimismo, está depositada en GenBank® la secuencia de un aislado obtenido de aguas residuales reutilizadas y que es muy similar a una de las de nuestro estudio (Moreno-Mesonero et al., 2022) (Anexo 5).

Al realizar las comparaciones de las secuencias del ST3 con las almacenadas en GenBank® se observó que los países donde se obtienen secuencias similares de origen humano más similares fueron México, Colombia, Alemania, Corea del Sur, Filipinas, Malasia, Libia, Egipto, Turquía (Abdulsalam et al., 2013a; Noradilah et al., 2017b; Rivera, 2008; Santín et al., 2011; Sarzhanov et al., 2021; Wylezich et al., 2020). También se encuentra una alta homología con secuencias de animales en EEUU (ganado vacuno – *Bos taurus*), España (ganado vacuno – *Bos taurus* y cercopiteco de cara de búho – *Cercopithecus hamlyni*), Irán (rata común – *Rattus norvegicus*), Malasia (perro – *Canis lupus familiaris* perro), China (macaco cola de cerdo norteamericano)

– *Macaca leonina*, mono patas – *Erythrocebus patas* y cebra – *Equus zebra*), Japón (macaco cola de cerdo sureño – *Macaca nemestrina*) (Abe, 2004; Santín et al., 2011; Noradilah et al., 2017b; Maloney et al., 2019b; Abarca et al., 2021), así como secuencias de aguas de río y lago en Polonia (Anexo 6).

Finalmente, las secuencias del ST4 que se compararon con las disponibles en GenBank® revelan una elevada similitud con las de origen humano procedentes de EEUU, Alemania, Turquía y China (Maloney et al., 2020b; Sarzhanov et al., 2021; Yoshikawa et al., 2004a; Zhang et al., 2021), siendo además destacable la homología con numerosas secuencias de animales recogidas en EEUU (venado de cola blanca – *Odocoileus virginianus*), España (zorro rojo – *Vulpes vulpes*, lémur de cola anillada – *Lemur catta* y rata común – *Ratus spp.*), Francia (rata de laboratorio – Rata wistar), Irán (gato domestico – *Felis catus domesticus* y perro – *Canis lupus familiaris*), Japón (rata marrón de Noruega – *Rattus norvegicus* y canguro de árbol de Goodfellow – *Dendrolagus goodfellowi*), China (rata de laboratorio – Rata wistar, cisne cantor – *Cygnus cygnus*, coipu – *Myocastor coypus*, oso – *Ailuropoda melanoleuca*, mono patas – *Erythrocebus patas*, ciervo almizclero alpino – *Moschus chrysogaster* y cobaya domesticado – *Cavia porcellus*), Indonesia (rata de la Polinesia – *Rattus exulans*), Malasia (perro – *Canis lupus familiaris* y cabra – *Capra hircus*) y Corea del Sur (venado acuático chino – *Hydropotes inermis argyropus*) (Noël et al., 2005; Noradilah et al., 2017b; Katsumata et al., 2018; Calero-Bernal et al., 2020; Maloney et al., 2021a; Köster et al., 2021; Liu et al., 2022) (Anexo 7). Es relevante señalar que muchas de las secuencias de ST4 depositadas en GenBank® proceden de diversas especies de roedores, lo que apoya las afirmaciones de algunos estudios que los consideran como principales hospedadores de esta variante (Silberman et al., 1996; Yoshikawa et al., 1998; Noël et al., 2003, 2005).

En España y además de los realizados en humanos, son diversos los estudios donde se analizan aislados de *Blastocystis* sp. de origen animal o ambiental. Concretamente, un trabajo con muestras fecales de carnívoros de vida libre en España (Andalucía, País Vasco, Castilla y León, Castilla-La Mancha y Extremadura) identificó varios subtipos de *Blastocystis*, entre ellos los ST2 y ST4 obtenidos de *Vulpes vulpes* altamente similares a las secuencias del presente estudio (Calero-Bernal et al., 2020). Algo semejante se observa al comparar con variantes ST2 obtenidas de aguas residuales urbanas en Valencia, que fue el subtipo más frecuente en dicho estudio (Moreno-Mesonero et al., 2022). También se ha encontrado una similitud alta con secuencias ST3 de aislados de *Blastocystis* de ganado vacuno en Álava (Abarca et al., 2021) o

incluso con secuencias de ST4 de *Blastocystis* procedentes de *Rattus* spp. según un trabajo en un zoológico de Córdoba (Köster et al., 2021).

La elevada homología entre aislados de *Blastocystis* sp. obtenidos en regiones geográficas en ocasiones distantes y procedentes de diversos animales, sugiere que podríamos estar ante una zoonosis y por tanto nos enfrentamos a un problema de salud pública, ya que el control poco eficiente del tratamiento de aguas y de animales podría ser fuente de enfermedades en humanos. Por otra parte, y al igual que sucede con otros muchos microorganismos, su difusión en todo el mundo se ve facilitada actualmente por la elevada movilidad que permite desplazarnos a largas distancias en cuestión de horas, circunstancia que también explicaría la homología en ocasiones de hasta 100% entre las secuencias de nuestro estudio y las obtenidas en países lejanos.

El estudio también manifiesta la conveniencia de explorar comunidades rurales y urbanas bajo el concepto de One Health, para determinar si ocurren patrones similares de transmisión, y valorar si los diferentes subtipos tienen un comportamiento patógeno o comensal en diversas especies animales. En pocas palabras, sería un gran avance complementar con estudios culturómicos y metagenómicos de la microbiota (residentes patógenos y no patógenos del intestino) ya que contribuirían significativamente a descubrir el verdadero papel de *Blastocystis* en la salud y enfermedad intestinal.

Diferentes autores han señalado que la discriminación de alelos de *Blastocystis* puede proporcionar información útil sobre su especificidad del hospedador, distribución geográfica o manifestaciones clínicas (Alfellani et al., 2013a; Ramírez et al., 2016, 2014; Casero et al., 2015). En nuestro estudio, el número de alelos obtenidos dentro de cada subtipo fue reducido. La mayor diversidad la observamos en ST1, del que se identificaron tres alelos (2, 4 y 88), cifra semejante a la descrita por otros autores (Tabla 21). La mayor parte de publicaciones en Europa describen el alelo 4, mientras que el 88 no se había identificado previamente en humanos en el continente europeo, pero sí en el Medio Oriente y en América, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Candela et al., 2021; Öncü Öner et al., 2022; Rahimi et al., 2022). Nuestro análisis encuentra además diferencias altamente significativas para el alelo 88 al comparar con pacientes procedentes de Asia.

En el ST2 se identificaron dos alelos (9 y 13), siendo el primero el más frecuente (Tabla 22). Estudios realizados por Ramírez et al. mostraron que el alelo 9 era el más prevalente tanto

en humanos como en animales en América del Sur (Ramírez et al., 2014, 2016, 2017). En nuestro país, el alelo 9 fue también el más frecuente en niños que asistían a guarderías (Hernández-Castro et al., 2023), pero otros estudios en humanos y animales indican que el alelo predominante de ST2 es el 12, no identificado por nosotros, e incluso dos de ellos no encontraron el alelo 9 (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021). En nuestro caso, de las quince secuencias que presentaron el alelo 9, más de la tercera parte (7/15) eran de personas procedentes de África (n: 5) y América (n: 2), lo que podría explicar su alta frecuencia en este trabajo y no en otras zonas de nuestro país. Además, el alelo 9 se ha observado en estudios en perros y ratas lo que sugeriría una posible transmisión zoonótica (Ramírez et al., 2014; Mohammadpour et al., 2020).

En el subtipo ST3 observamos dos alelos (34 y 36) con claro predominio del primero de ellos, que es también el más frecuente en la población europea (Tabla 23) (Oliveira-Arbex et al., 2018; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021). El alelo 36 es sin embargo predominante en niños africanos (Muadica et al., 2021), continente donde algunos estudios no detectan el alelo 34 (Poulsen et al., 2016). Nuestros hallazgos también revelan diferencias significativas en la distribución de estos alelos según el origen geográfico, siendo predominante el alelo 34 en personas procedentes de España y el alelo 36 en las procedentes de América. El alelo 34 también se ha señalado como dominante en primates no humanos (Alfellani et al., 2013a) y ganado bovino (Ramírez et al., 2014), lo que sugiere una fuerte probabilidad de transmisión zoonótica.

El ST4 fue el menos variable en este estudio, habiéndose observado un único alelo (42) (Tabla 24), lo que coincide con los hallazgos de otras publicaciones (Muadica et al., 2021, 2020; Osorio-Pulgarin et al., 2021; Paulos et al., 2018). El subtipo 4 es prevalente en roedores y el alelo 42 también ha sido detectado en gatos callejeros, lo que de nuevo sugiere que estos animales podrían ser una fuente de transmisión de *Blastocystis* a humanos (Mohammadpour et al., 2020; Can et al., 2021; Barati et al., 2022).

En relación al análisis por Neighbor Joining (Figura 17 y Figura 18), la comparación de secuencias ST1 y ST2 muestra una alta variabilidad en los árboles filogenéticos, lo que sugiere que la infección por *Blastocystis* debida a estas cepas es de origen polifilético y pudiera tener procedencia muy diversa de humanos o animales. También pudiera ocurrir que las infecciones por estos subtipos sean más antiguas y hayan tenido un largo proceso evolutivo en el tiempo (Wibowo et al., 2021). Sin embargo, en el caso del subtipo más prevalente (ST3) destaca la

escasa variabilidad, lo que podría explicarse por su mayor grado de infectividad y capacidad de contagio. Su transmisión potencialmente zoonótica tampoco se excluye en este caso, aunque de muy pocos orígenes y con un tiempo evolutivo más corto.

La mayor homogeneidad genética es la apreciada en el ST4, cuya distribución geográfica está aparentemente más restringida, sobre todo en Europa. Esta circunstancia sugiere que su transmisión a los humanos es más reciente que la de otros subtipos; además se aprecia que las secuencias de ST4 de ratas, cobayos, zarigüeyas y de la mayoría de seres humanos parecen genéticamente idénticas, por lo que no parece arriesgado afirmar la transmisión zoonótica de este subtipo. Los datos respaldan la teoría de que los roedores pueden ser un reservorio de infecciones humanas por el ST4 de *Blastocystis* como se mencionó previamente (Noël et al., 2005; Stensvold et al., 2012; Ramírez et al., 2014). Esta circunstancia unida al hecho de que todos los pacientes en los que se identificó este subtipo son de origen español, y que las dos secuencias con homologías menores del 100% (1069 y 1418) procedían de pacientes que vivían en la zona rural de Zaragoza, debe hacernos reflexionar sobre la necesidad de llevar a cabo un eficiente control de roedores en el entorno urbano, periurbano y rural. En ese sentido, aun existiendo dudas sobre el carácter patógeno de *Blastocystis* sp., es evidente que la aparición de ST4 en muestras humanas es puede ser indicio de posible transmisión zoonótica desde los roedores.

Los resultados de DnaSP mostraron que la diversidad de haplotipos, diversidad de nucleótidos y número de sitios de polimórficos era distinta entre los subtipos (Tabla 25). Como se mencionó previamente, el análisis molecular realizado reveló que la mayor diversidad de haplotipos y de sitios polimórficos se encontró en el ST1 y la menor diversidad de haplotipos y sitios polimórficos en el ST4. Además, se evidenció que la homología de secuencias fue más alta en el ST4 y baja en el ST1 lo que coincide con los resultados de la diversidad genética.

Rezaei Riabi et al., (2018) hallaron que la diversidad de haplotipos más alta y más baja se observó en ST2 (Hd: 0,934) y ST1 (Hd: 0,564), respectivamente. Sin embargo, Wakid et al.,(2022) confirmaron que el ST1 tenía mayores variaciones genéticas que ST3, con mayor diversidad de haplotipos y mayor número de sitios polimórficos, lo cual coincide con nuestros resultados. En el presente trabajo también se observa que la mayor diversidad de nucleótidos la encontramos en el subtipo ST2 (π : 0.03945), variable que otros autores asignan al ST3 (Rezaei Riabi et al., 2018; Delshad et al., 2020). En conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto el alto grado de variabilidad del fragmento amplificado del gen SSU-rRNA en estos subtipos en los

aislados de *Blastocystis*, dos de los cuales (ST1 y ST2) parecen presentar mayor tiempo de evolución y otros dos (ST3 y ST4) que serían más recientes en el tiempo.

8. CONCLUSIONES

Primera. El diagnóstico microscópico de muestras fecales de pacientes con síntomas gastrointestinales revela que *Blastocystis* sp. es el parásito intestinal más prevalente (9,2%) en el área sanitaria 3 de Zaragoza, siendo además el único parásito identificado en la mayoría de pacientes infectados.

Segunda. La parasitación por *Blastocystis* sp. afecta a individuos de todos los grupos de edad, aunque la probabilidad de estar infectado se incrementa significativamente en los individuos de bajo peso y en aquéllos procedentes de América Central y del Sur, y especialmente de África.

Tercera. La eosinofilia relativa en sangre periférica y co-infección intestinal con bacterias patógenas están asociadas positivamente a la infección por *Blastocystis* sp., al igual que determinados síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, anorexia y halitosis), pero no lo están la presencia de diarrea, fiebre o procesos como el síndrome de colon irritable.

Cuarta. La presencia de diabetes mellitus tipo 2 o la administración de determinados tratamientos inmunosupresores, como quimioterapia, anticuerpos monoclonales o fármacos antirretrovirales es significativamente más frecuente entre los pacientes infectados por *Blastocystis* sp., lo que apoyaría su papel como microorganismo oportunista.

Quinta. El estudio molecular revela que la distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. que infectan a humanos presenta variaciones con respecto a otras zonas geográficas de España, circunstancia que podría relacionarse con el alto porcentaje de inmigrantes residentes en la población analizada, habiéndose identificado dos subtipos predominantes (ST2-ST3) y dos minoritarios (ST1-ST4).

Sexta. En algunos pacientes se evidencian infecciones mixtas por distintos subtipos de *Blastocystis* sp. mediante la presencia de picos dobles en trazos de los cromatogramas tras secuenciación Sanger del gen SSU-rRNA.

Séptima. El análisis de las secuencias de los distintos subtipos ha revelado alelos no descritos previamente (88 - ST1) y otros comunes con aislados de origen animal (9 - ST2, 34 - ST3, 42 - ST4), así como una elevada homología con aislados de *Blastocystis* sp. de origen humano y de diversas especies animales obtenidos en regiones geográficas en ocasiones distantes, hallazgo que sustentaría el carácter zoonótico potencial de este parásito.

Octava. El estudio filogenético mediante análisis por Neighbor Joining evidencia que la definición de alelos de *Blastocystis* sp. tal como se entiende actualmente no muestra toda la variabilidad genética del parásito. La mayor variabilidad se observa en los subtipos ST1 y ST2 lo que sugiere un origen polifilético de estas variantes, indicativo de una procedencia diversa o un proceso evolutivo más largo. La mayor homogeneidad se observa en los subtipos ST3 y especialmente ST4, lo que indicaría su origen monofilético y por tanto una más reciente transmisión a los humanos.

9. ANEXOS Y TRABAJOS

Anexo 1 Dictamen favorable del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA)



Informe Dictamen Favorable
Trabajos académicos

C.P. - C.I. P118/081

18 de mayo de 2022

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 18/05/2022, Acta Nº 10/2022 ha evaluado la notificación de cambio de directores sobre el Trabajo:

Título: Estudio epidemiológico de *Blastocystis hominis* en Aragón.

Alumna: Cristina Matovelle Ochoa

Directores: Luis Vicente Monteagudo Ibáñez y Joaquín Quilez Cinca

Versión protocolo: V2 (10-04-2018)

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, el cumplimiento de la LOPD y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto y la modificación propuesta.**

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ
HINJOS MARIA -
DNI 03857456B

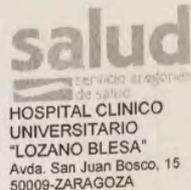
Firmado digitalmente
por GONZALEZ HINJOS
MARIA - DNI 03857456B
Fecha: 2022.05.23
14:24:07 +02'00'

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Anexo 2 Autorización del jefe de Servicio del Servicio de Microbiología y Parasitología y autorización de la dirección médica y de docencia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza



GOBIERNO DE ARAGON
Departamento de Sanidad



salud
servicio aragonés de salud
HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO "LOZANO BLESA"
Avda. San Juan Bosco, 15
50009-ZARAGOZA

ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD Y DE FINALIDAD DE USO EN ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN

D/ Dña: Cristina Ofelia Matovelle Ochoa, con DNI Y3846496J, domiciliado en Calle Pianista Luis Galve N.2 escalera 1, planta 10, apartamento 123, dependiente de la Institución Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, con título de proyecto Epidemiología de *Blastocystis hominis* en Aragón, asume que está sujeto al deber de secreto con respecto a los datos a los que tenga acceso y, por tanto, estará obligado a no reproducir, modificar, hacer pública o divulgar a terceros la información a la que pueda tener conocimiento con motivo de la realización de un proyecto de investigación dentro del Sector Zaragoza III. Sólo podrán divulgarse, en medios y con fines exclusivamente científicos los resultados derivados de los objetivos propios de la investigación, aunque siempre asegurando que no existe posibilidad alguna, bien directa o indirectamente, de identificar personalmente a los pacientes.

El solicitante se reconoce con capacidad para obligarse a cumplir el presente Acuerdo de Confidencialidad y No Divulgación de Información en base a las siguientes **ESTIPULACIONES:**

Primera: El solicitante únicamente podrá utilizar la información para fines ligados a la realización del proyecto de investigación, comprometiéndose a mantener la más estricta confidencialidad de la información, aún después de la conclusión de dicho proyecto.

Segunda: Que, de conformidad con lo establecido en la Ley 41/2002, el acceso a la Historia Clínica con fines de investigación, obliga a preservar los datos de identificación personal de paciente, separados de los de carácter clínico-asistencial, de manera que quede asegurado el anonimato, salvo que el propio paciente haya dado su consentimiento para no separarlos.

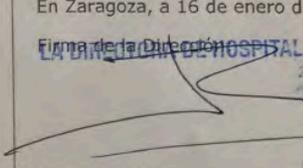
Tercera: En caso de que la información resulte relevada o divulgada por cualquier medio (impreso, gráfico, electrónico, etc.,) por el solicitante, de cualquier forma distinta del objeto de este Acuerdo, ya sea de carácter doloso o por mera negligencia, será responsable de acciones civiles o penales en su contra emprendidas por la autoridad correspondiente.

Cuarta: El solicitante se obliga a devolver la información en cualquier momento en el supuesto que existiere un cese de la relación entre ambas partes por cualquier motivo.

Quinta: El presente Acuerdo entrará en vigor en el momento de la firma por ambas partes, extendiéndose su vigencia de forma indefinida.

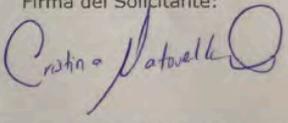
En Zaragoza, a 16 de enero de 2018

Firma de la Dirección:



Fdo.: Isabel Gutiérrez Cía

Firma del Solicitante:



Fdo.: Cristina Matovelle Ochoa

Anexo II: PE-03-1_Z3(X)_Rev.B_Acuerdo de Confidencialidad.

Anexo 2 Autorización del jefe de Servicio del Servicio de Microbiología y Parasitología y autorización de la dirección médica y de docencia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza

Epidemiología de <i>Blastocystis hominis</i> en Aragón			
Nombre del Responsable: Cristina Matovelle Uchoa 		Categoría profesional: Médico residente de segundo año de Microbiología y Parasitología	
Dirección: Departamento de Sanidad Calle Pianista Luis Galve N.2 escalera 1, planta 10, apartamento 123		Teléfono de contacto: +34 651198504	E-mail de contacto: crismatovelle@gmail.com
Tutor del Proyecto: (Nombre del Tutor, Categoría profesional, Centro Sanitario del Sector III, y Servicio en el que trabaja) Encarnación Rubio Aranda. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública (Área de Bioestadística). Facultad de Medicina. M ^a Pilar Goñi Cepero. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública (Área de Parasitología). Facultad de Medicina.			
Tipo de Proyecto:			
<input checked="" type="checkbox"/>	Tesis doctoral	<input checked="" type="checkbox"/>	Trabajo fin de Master
<input type="checkbox"/>	Comunicación	<input type="checkbox"/>	Trabajo de campo
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Proyecto FIS o similar
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Otros
Resumen: (máximo 300 palabras)			
1.- Justificación: <p><i>Blastocystis hominis</i> es el protozoo más frecuentemente identificado en heces humanas en todo el mundo, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos. El gran desconocimiento existente acerca de este parásito y su amplia distribución, hacen que se le considere como protozoo comensal, asumiendo su participación en la patología clínica del paciente solamente en aquellos casos en que la carga parasitaria es elevada (> 5 parásitos /campo). Por este motivo, son pocos los estudios dirigidos a profundizar en la epidemiología de este protozoo.</p>			
2.- Objetivos: <p>El objetivo del estudio es revisar las características epidemiológicas y clínicas de los portadores de <i>Blastocystis hominis</i> para así tener una información propia de Aragón que permita conocer la distribución y el efecto en la sintomatología del protozoo en nuestra área geográfica, estableciendo así una situación previa al estudio prospectivo que comenzaremos posteriormente.</p> <p>En el estudio prospectivo (Tesis doctoral), se genotiparán las muestras en las que se identifique <i>Blastocystis hominis</i> para determinar asociaciones entre genotipo y características del paciente y sintomatología.</p>			
3.- Metodología: <p>Se realizará una revisión retrospectiva de todos los datos de coprocultivos y estudios parasitológicos realizados en los últimos años en el servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y así definir un perfil clínico epidemiológico de los pacientes positivos para <i>Blastocystis hominis</i>. Con el fin de buscar asociación entre diversas características clínico-epidemiológicas y coprocultivo positivo para <i>Blastocystis hominis</i>. Posteriormente, y utilizando técnicas de biología molecular sobre las muestras de heces que vayan saliendo positivas, y programas bioinformáticos, se llevará a cabo la identificación de las poblaciones de <i>Blastocystis</i> circulantes en nuestro ámbito geográfico.</p>			
4.- Aspectos Éticos: <p>Se solicita permiso para la recogida de datos y muestras al Jefe de Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Blesa.</p> <p>Las muestras de heces recogidas, se codificarán con un número de registro similar al que figure en la ficha de recogida de datos del paciente. Dichos datos serán de carácter socio demográfico y de sintomatología, no figurando en ningún caso sus datos personales, lo que garantiza la confidencialidad. La solicitante, se compromete además a incluir como coautor de las posibles publicaciones científicas a todas aquellas personas del hospital que de alguna manera pudieran colaborar en la recogida de datos o muestras.</p>			

Anexo 2 Autorización del jefe de Servicio del Servicio de Microbiología y Parasitología y autorización de la dirección médica y de docencia del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza

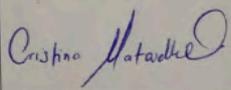
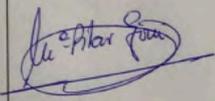


GOBIERNO DE ARAGON
Departamento de Sanidad



salud
servicio aragonés de salud
HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO "LOZANO BLESA"
Avda. San Juan Bosco, 15
50009-ZARAGOZA

Anverso del **Anexo I**: PE-03-1_Z3(X)_Rev.B_Solicitud para realizar Proyectos de Investigación en el Sector III.

Recursos solicitados:			
<input type="checkbox"/>	Revisión de historias clínicas	<input checked="" type="checkbox"/>	Uso de bases de datos
<input type="checkbox"/>	* Realización de pruebas diagnósticas	<input type="checkbox"/>	* Aplicación de tratamientos
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Aplicación de encuestas
<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	* Otros: muestras
<p><i>*Nota: Describir el tipo de pruebas diagnósticas, tratamiento a utilizar o en su caso cualquier otro recurso solicitado.</i></p> <p>Se realizarán pruebas de biología molecular sobre muestras de heces, con cargo a líneas de investigación del grupo emergente B124 (Universidad de Zaragoza), por lo que no se requieren recursos por parte del Hospital, salvo el acceso a datos y muestras.</p>			
<p>Duración y cronograma de actividades:</p> <p>Se llevará a cabo en un plazo de 9 meses, desde enero de 2018 a septiembre de 2018, la primera parte de recogida de datos y su análisis. La etapa posterior, prevé el comienzo de recogida de muestras en cuanto nos sea concedido el permiso, hasta un plazo de finales de 2019.</p>			
<p>Análisis de costes: <i>(Especificar los costes derivados de la realización del Proyecto)</i></p> <p>Este trabajo de investigación no supone coste alguno para el Hospital.</p>			
Firma del Solicitante:	Firma del Tutor:	Firma del Jefe de Servicio y/o Coordinador del Centro de Salud dónde se desarrolle:	
			
Lugar y Fecha			
En, Zaragoza, a 16 de Enero de 20018			

Reverso del **Anexo I**: PE-03-1_Z3(X)_Rev.B_Solicitud para realizar Proyectos de Investigación en el Sector III.

Anexo 4 Comparaciones de las secuencias genéticas obtenidas del ST1 con las secuencias genéticas almacenadas en la base de datos del GenBank®

Homología	Nº secuencia	Nº GenBank	País	Origen
100.00	1008	MK244898.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
99.74	1008	AB107961.1	Japón	<i>Sus scrofa domesticus</i>
99.48	1008	MK874817.1	México	<i>Homo sapiens</i>
97.15	1008	HQ641639.1	España	Primate - <i>Hapalemur aureus</i>
96.89	1008	OP020687.1	China	<i>Macaco Rhesus</i>
100.00	1137	MK801377.1	Alemania	<i>Sus scrofa domesticus</i>
100.00	1137	GU992411.1	Filipinas	Aguas residuales
99.47	1137	MK244899.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
99.47	1137	AB107967.1	Japón	<i>Pongo pygmaeus</i>
100.00	1173	MN326610.1	China	<i>Sus scrofa domesticus</i>
100.00	1173	HQ641595.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
99.72	1173	MN918264.1	Polonia	Agua de la laguna
99.72	1173	KU147338.1	México	<i>Homo sapiens</i>
99.72	1173	KX358438.1	Laos	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1246	ON834472.1	China	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
99.17	1246	OM057402.1	China	<i>Panthera leo</i>
98.33	1246	KX108707.1	Malasia	<i>Homo sapiens</i>
96.39	1246	AB091240.1	Japón	<i>Gallus gallus domesticus</i>

Anexo 5 Comparaciones de las secuencias genéticas obtenidas del ST2 con las secuencias genéticas almacenadas en la base de datos del GenBank®

Homología (%)	Nº secuencia	Nº GenBank	País	Origen
100.00	1035	HQ641599.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1035	KF242003.1	Países Bajos	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1035	MW728061.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.54	1035	OK599025.1	España	Aguas residuales reutilizadas
99.54	1035	MT186221.1	Corea del Sur	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1055	KY823332.1	China	<i>Macaca mulata</i>
100.00	1055	MW728087.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.51	1055	ON287224.1	Irán	<i>Canis lupus familiaris</i>
99.52	1055	MG729833.1	Irán	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1172	MN396290.1	Irán	<i>Homo sapiens</i>
99.70	1172	MW728082.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.41	1172	KX524051.1	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
99.11	1172	AM275383.1	Dinamarca	<i>Homo sapiens</i>
99.11	1172	MK874815.1	México	<i>Homo sapiens</i>
99.11	1172	KX524009.1	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
99.11	1172	MW728071.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.11	1172	HQ641620.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
98.52	1172	MK587496.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
98.52	1172	OM057419.1	China	<i>Equus zebra</i>
98.52	1172	HQ641645.1	España	<i>Cercopithecus hamlyni</i>
98.22	1172	MK801365.1	Alemania	<i>Sus scrofa domesticus</i>
99.78	1198	MW728082.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.34	1198	OM057419.1	China	<i>Equus zebra</i>
99.12	1198	ON834473.1	China	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
98.90	1198	MK587496.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
98.90	1198	HQ641645.1	España	<i>Cercopithecus hamlyni</i>
97.37	1198	KF306292.1	Libia	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1255	MK801368.1	Alemania	<i>Sus scrofa domesticus</i>
99.12	1255	KF242035.1	Países Bajos	<i>Homo sapiens</i>
98.23	1255	HQ641617.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
97.94	1255	MW728075.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>

Anexo 6 Comparaciones de las secuencias genéticas obtenidas del ST3 con las secuencias genéticas almacenadas en la base de datos del GenBank®

Homología (%)	Nº secuencia	Nº GenBank	País	Origen
100.00	1004	MZ700054.1	México	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1004	MZ664547.1	España	<i>Bos taurus</i>
99.77	1004	MN918263.1	Polonia	Agua de río
99.77	1004	MT903362.1	Corea del Sur	<i>Homo sapiens</i>
99.30	1004	HQ641610.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1156	EU445496.1	Filipinas	<i>Homo sapiens</i>
99.76	1156	MN918265.1	Polonia	Agua de lago
99.51	1156	MN264510.1	Irán	<i>Rattus norvegicus</i>
99.27	1156	HQ641610.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1135	KY290430.1	Malasia	<i>Homo sapiens</i>
99.75	1135	KX234611.1	Malasia	<i>Canis lupus familiaris</i>
95.35	1135	HQ641651.1	España	<i>Cercopithecus hamlyni</i>
94.65	1135	OM057426.1	China	<i>Macaca leonina</i>
93.95	1135	MN918265.1	Polonia	Agua de lago
93.95	1135	MT903380.1	Corea del Sur	<i>Homo sapiens</i>
93.95	1135	MW662481.1	Colombia	Uniq24-ST3
100.00	1369	MT089925.1	Egipto	<i>Homo sapiens</i>
99.78	1369	OM057422.1	China	<i>Erythrocebus patas</i>
98.89	1369	KF306291.1	Libia	<i>Homo sapiens</i>
98.89	1369	AB107969.1	Japón	<i>Macaca nemestrina</i>
97.78	1369	OM057419.1	China	<i>Equus zebra</i>
97.78	1369	MW728077.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1382	HQ641611.1	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
99.75	1382	MN918261.1	Polonia	Agua de río
99.51	1382	MN914081.1	Alemania	<i>Homo sapiens</i>
98.77	1382	MK244903.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>

Anexo 7 Comparaciones de las secuencias genéticas obtenidas del ST4 con las secuencias genéticas almacenadas en la base de datos del GenBank®

Homología (%)	Nº secuencia	Nº GenBank	País	Origen
100.00	1069	MK244908.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
99.75	1069	MT071885.1	China	Rata wistar
99.75	1069	AY590114.1	Francia	Rata wistar
99.75	1069	MK587493.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
99.75	1069	MT898452.1	EEUU	<i>Homo sapiens</i>
99.51	1069	ON394480.1	China	<i>Cygnus cygnus</i>
99.51	1069	MZ267667.1	EEUU	<i>Odocoileus virginianus</i>
99.51	1069	AY244619.1	Alemania	<i>Homo sapiens</i>
99.01	1069	MH127500.1	Japón	<i>Rattus novercious</i>
98.77	1069	KX234618.1	Malasia	<i>Canis lupus familiaris</i>
98.52	1069	OK235458.1	China	<i>Myocastor coypus</i>
97.95	1069	ON834467.1	China	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
100.00	1158	MK587493.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
100.00	1158	MK244907.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
100.00	1158	OM057428.1	China	<i>Erythrocebus patas</i>
100.00	1158	MZ267653.1	EEUU	<i>Odocoileus virginianus</i>
100.00	1158	AY590114.1	Francia	Rata wistar
99.32	1158	MW728074.1	Turquía	<i>Homo sapiens</i>
99.32	1158	MZ613336.1	China	<i>Moschus chrysogaster</i>
99.32	1158	MT114835.1	Corea del Sur	<i>Hydropotes inermis argyropus</i>
99.32	1158	AB091251.1	Japón	<i>Rattus Norvegicus</i>
98.88	1158	MH127478.1	Indonesia	<i>Rattus exulans</i>
98.88	1158	KX234637.1	Malasia	<i>Capra aegagrus hircus</i>
98.88	1158	MN264520.1	Irán	<i>Felis catus domesticus</i>
100.00	1288	MK587493.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
100.00	1288	MK244908.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
100.00	1288	OM865862.1	China	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1288	OM057427.1	China	<i>Cavia porcellus</i>
100.00	1288	MT898453.1	España	<i>Homo sapiens</i>
100.00	1288	EU427516.1	Japón	<i>Dendrolagus goodfellowi</i>
99.53	1288	MW581486.1	España	<i>Ratus spp.</i>
99.53	1288	MW798739.1	China	<i>Homo sapiens</i>
99.53	1288	MH127487.1	Indonesia	<i>Rattus exulans</i>
100.00	1418	MK244908.1	EEUU	<i>Bos taurus</i>
100.00	1418	MK587493.1	España	<i>Vulpes vulpes</i>
100.00	1418	OM057428.1	China	<i>Erythrocebus patas</i>
99.78	1418	MZ267653.1	EEUU	<i>Odocoileus virginianus</i>
99.56	1418	ON394480.1	China	<i>Cygnus cygnus</i>
99.12	1418	MH127494.1	Japón	<i>Rattus novercious</i>
98.69	1418	HQ641652.1	España	Primate - <i>Lemur catta</i>

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST5 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST8 (%)	ST12 (%)	ST16 (%)	ST Mixto (%)	ST D/ST n (%)*	Referencia	
América	EEUU	SEC**	9	1 (11)	-	6 (67)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (22)	Jones et al., 2009	
	Colombia	SEC	14	4 (28,6)	1 (7,1)	3 (21,4)	2 (14,3)	-	-	-	-	-	-	4 (28,6)	-	Santín et al., 2011	
	Brasil	SEC	80	33 (41)	27 (34)	13 (16)	-	-	-	-	-	-	-	7 (9)	-	Malheiros et al., 2011	
	EEUU	SEC	10	2 (20)	3 (30)	5 (50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Scanlan et al., 2016	
	Bolivia	SEC	40	-	13 (32,5)	12 (30)	-	8 (20)	-	-	-	3 (7,5)	-	-	-	4 (10)	
	Ecuador	SEC	25	3 (12)	-	21 (84)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (4)	
	Perú	SEC	13	-	-	12 (92)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (8)	Ramírez et al., 2016
	Brasil	SEC	22	2 (9)	7 (32,5)	8 (36)	-	-	-	-	1 (4,5)	2 (9)	-	-	-	2 (9)	
	Colombia	SEC	181	82 (45)	47 (26)	33 (18)	7 (4)	-	4 (2)	4 (2)	7 (4)	-	-	-	-	1 (1)	
	Argentina	SEC	65	11 (17)	10 (15)	41 (63)	-	-	3 (5)	-	-	-	-	-	-	-	
	Brasil	STS	64	23 (36)	4 (6)	27 (42)	1 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	9 (14)	Valença Barbosa et al., 2017
	Colombia	SEC	256	52 (20,31)	47 (18,4)	134 (52,34)	2 (0,8)	-	5 (1,9)	2 (0,8)	-	-	-	-	-	14 (5,5)	Ramírez et al., 2017
	Brasil	SEC	57	31 (54,4)	4 (7)	19 (33,3)	-	-	-	-	3 (5,3)	-	-	-	-	-	Oliveira-Arbex et al., 2018
	Colombia	SEC	59	12 (20,3)	14 (23,7)	18 (30,5)	3 (5,1)	-	1 (1,7)	-	-	-	-	9 (15,3)	2 (3,4)	-	Osorio-Pulgarín et al., 2021

ST D/ST n *: ST desconocido/ST nuevo; SEC*: Secuenciación

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST5 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST8 (%)	ST9 (%)	ST Mixto (%)	ST D/ST n (%)	Referencia
Europa															
	Alemania	RLFP*	78	18 (23)	1 (1,3)	51 (65,4)	5 (6,4)	-	-	-	-	-	-	3 (3,8)	Böhm-Gloning et al., 1997
	Reino Unido	RLFP	29	2 (6,9)	1 (3,4)	22 (75,9)	4 (13,8)	-	-	-	-	-	-	-	Clark, 1997
	Alemania	ST5**	12	3 (25)	2 (16,7)	5 (41,7)	2 (16,7)	-	-	-	-	-	-	-	Yoshikawa et al., 2004
	Dinamarca	SEC	29	1 (3,4)	6 (20,7)	15 (51,7)	7 (24,1)	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al., 2006
	Reino Unido	SEC	49	2 (4)	8 (16,3)	20 (40,8)	16 (32,7)	-	-	-	1 (2)	-	1 (2)	-	Sciulina et al., 2006
	Dinamarca	SEC	28	5 (17,9)	9 (32,1)	13 (46,4)	1 (3,6)	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al., 2007
	Grecia	SSCP [§]	45	9 (20)	6 (13,3)	27 (60)	1 (2,2)	-	1 (2,2)	1 (2,2)	-	-	-	-	Menounos et al., 2008
	Irlanda	SEC	14	1 (7)	6 (43)	4 (29)	3 (21)	-	-	-	-	-	-	-	Scanlan and Marchesi, 2008
	España	RLFP	51	1 (1,9)	2 (3,9)	-	48 (94,2)	-	-	-	-	-	-	-	Dominguez-Márquez et al., 2009
	Francia	SEC	46	11 (24)	4 (8,5)	23 (50)	4 (8,5)	-	-	1 (2)	-	-	3 (7)	-	Souppart et al., 2009
	Dinamarca	SEC	24	2 (8,3)	3 (12,5)	6 (25)	9 (37,5)	-	-	-	-	1 (4,2)	3 (12,5)	-	Stensvold et al., 2009
	Dinamarca	SEC	99	20 (20,2)	15 (15,2)	39 (39,4)	16 (16,1)	-	1 (1)	-	1 (1)	-	7 (7)	-	Rene et al., 2009
	Dinamarca	SEC	25	1 (4)	4 (16)	1 (4)	19 (76)	-	-	-	-	-	-	-	Stensvold et al., 2011a
	Dinamarca	SEC	22	9 (41)	-	11 (50)	-	-	-	-	-	-	2 (9)	-	Stensvold et al., 2011b
	Francia	SEC	27	1 (3,7)	1 (3,7)	4 (14,8)	17 (63)	-	1 (3,7)	3 (11,1)	-	-	-	-	Poirier et al., 2011
	Italia	SEC	38	3 (8)	7 (18)	16 (42)	6 (16)	-	-	1 (2,5)	1 (2,5)	-	4 (11)	-	Meloni et al., 2011
	Suecia	SEC	63	10 (15,9)	9 (14,3)	30 (47,6)	13 (20,6)	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	Forsell et al., 2012
	Países Bajos	SEC	103	23 (22)	23 (22)	43 (42)	12 (12)	-	1 (1)	1 (1)	-	-	-	-	Bart et al., 2013
	Reino Unido	SEC	271	34 (13)	26 (10)	114 (42)	85 (31)	2 (0,7)	1 (0,3)	4 (1)	5 (2)	-	-	-	Alfellani et al., 2013
	Francia	SEC	143	28 (20)	18 (12)	61 (43)	28 (20)	-	3 (2)	3 (2)	-	-	2 (1)	-	El Saïadi et al., 2016
	España	SEC	53	7 (13,2)	33 (62,3)	9 (17)	4 (7,5)	-	-	-	-	-	-	-	Paulos et al., 2018
	Polonia	STS	122	16 (13,1)	24 (19,7)	72 (59)	-	-	4 (3,3)	4 (3,3)	-	-	2 (1,6)	-	Rudzińska et al., 2019
	España	SEC	162	37 (23)	59 (36)	35 (22)	30 (19)	-	-	-	1 (1)	-	-	-	Muadica et al., 2020
	Italia	NGS ^{§§}	142	41 (29)	23 (16)	57 (40)	12 (17)	-	-	3 (4)	-	-	-	-	Gabrielli et al., 2020

RLFP*: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; ST5**: sitio marcado con secuencia; \$SCPS: polimorfismo conformacional monocatenario; NGS\$: secuenciación de próxima generación

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de la muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST10 (%)	ST14 (%)	ST Mixto (%)	ST Desconocido/ST nuevo (%)	Referencia
África	Egipto	STS	44	8 (18,2)	-	24 (54,5)	-	8 (18,2)	4 (9,1)	-	-	-	-	Hussein et al., 2008
	Egipto	SEC	20	3 (15)	4 (20)	12 (60)	-	-	-	-	-	1 (5)	-	Souppart et al., 2010
	Egipto	STS	120	15 (12,5)	-	49 (41)	-	33 (27,5)	13 (10,8)	-	-	10 (8,2)	-	Fouad et al., 2011
	Liberia	SEC	30	7 (23,4)	7 (23,4)	8 (26,6)	3 (10)	-	-	-	-	5 (16,6)	-	Alfellani et al., 2013
	Libia	SEC	38	19 (50)	3 (8)	15 (39,4)	-	-	1 (2,6)	-	-	-	-	Alfellani et al., 2013
	Nigeria	SEC	23	10 (43,5)	-	9 (39,2)	3 (13)	-	-	-	-	1 (4,3)	-	Alfellani et al., 2013
	Senegal	SEC	93	25 (27)	15 (16)	45 (48)	-	-	-	-	-	8 (9)	-	El Safadi et al., 2014
	Túnez	SEC	61	18 (30)	10 (16)	31 (51)	1 (1,6)	-	1 (1,6)	-	-	-	-	Abda et al., 2017
	Senegal	SEC	588	113 (19)	226 (38)	107 (18)	-	-	3 (0,5)	2 (0,3)	2 (0,3)	135 (23)	-	Khaled et al., 2020
	Guinea	SEC	390	96 (24,5)	66 (16,9)	117 (30)	2 (0,5)	-	-	-	-	10 (3)	99 (25)	Guilavogui et al., 2022

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST5 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST Mixto (%)	ST D/ST n (%)	Referencia
Asia Central y OMC	Bangladesh	STS	26	2 (7,7)	-	24 (92)	-	-	-	-	-	-	Yoshikawa et al., 2004
	Pakistán	STS	10	2 (20)	-	7 (70)	-	-	1 (10)	-	-	-	Yoshikawa et al., 2004
	Irán	RIFP	45	20 (44,4)	4 (8,9)	16 (35,6)	-	-	2 (4,4)	3 (6,7)	-	-	Motazedian et al., 2008
	Turquía	SEC	87	8 (9,2)	12 (13,8)	66 (75,9)	1 (1,2)	-	-	-	-	-	Özyurt et al., 2008
	Turquía	STS	92	17 (18,5)	20 (21,7)	51 (55,4)	-	-	-	-	4 (4,3)	-	Dogruman-AI et al., 2008
	Turquía	STS	32	20 (63)	3 (9)	9 (28)	-	-	-	-	-	-	Eroglu et al., 2009
	Nepal	STS	20	4 (20)	4 (20)	12 (60)	-	-	-	-	-	-	Yoshikawa et al., 2009
	Turquía	STS	35	1 (2,9)	10 (28,6)	21 (60)	-	-	-	-	-	3 (8,6)	Dogruman-AI et al., 2009a
	Turquía	STS	66	10 (15)	9 (14)	38 (58)	-	-	-	-	9 (13)	-	Dogruman-AI et al., 2009b
	Pakistán	STS	179	87 (49)	10 (5,5)	49 (27,3)	8 (4,4)	7 (3,9)	6 (3,3)	10 (5,5)	-	2 (1)	Yakoob et al., 2010
	Turquía	STS	25	9 (36)	6 (24)	10 (40)	-	-	-	-	-	-	Eroglu and Koltas, 2010
	Irán	STS	174	48 (28)	7 (4)	53 (30)	-	33 (19)	-	-	33 (19)	-	Moosavi et al., 2012
	Nepal	STS	150	40 (27)	-	-	53 (35,3)	-	8 (5,3)	-	41 (27)	8 (5,3)	Lee et al., 2012
	Lebanon	SEC	36	11 (30,6)	12 (33,3)	12 (33,3)	1 (2,8)	-	-	-	-	-	El Safadi et al., 2013
	Qatar	SEC	114	31 (27,2)	4 (3,5)	79 (69,3)	-	-	-	-	-	-	Abu-Madi et al., 2015
	EAU	SEC	39	11 (28,2)	3 (7,6)	23 (58,9)	-	-	-	-	-	2 (5,1)	AbuOdeh et al., 2016
	Arabia Saudita	STS	50	19 (38)	20 (40)	-	-	-	11 (22)	-	-	-	A. M. Mohamed et al., 2017
	Arabia Saudita	SEC	133	19 (14,5)	7 (5)	107 (80,5)	-	-	-	-	-	-	R. T. Mohamed et al., 2017
	Irán	SEC	41	8 (19,5)	8 (19,5)	25 (61)	-	-	-	-	-	-	Mardani Katakati et al., 2019
	Siria	SEC	195	43 (22)	31 (15,8)	89 (45,7)	-	-	-	-	-	31 (16)	Khaled et al., 2021
Turquía	SEC	15	3 (20)	5 (33)	6 (40)	-	-	-	-	-	1 (6)	Melajim et al., 2021	
Arabia Saudita	SEC	96	51 (53,13)	44 (45,85)	1 (1,04)	-	-	-	-	-	-	Wakid et al., 2022	
Irán	SEC	13	13 (39,4)	5 (15,2)	14 (42,4)	-	-	-	-	1 (3)	-	-	Rahimi et al., 2022

OMC: Oriente Medio

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST9 (%)	ST Mixto (%)	ST D/ST n (%)*	Referencia
E y SE de Asia^{cc}													
	Japón	STS	32	1 (3,1)	-	30 (93,8)	-	1 (3,1)	-	-	-	-	Yoshikawa et al., 2000
	Japón	RLFP	55	11 (20)	12 (21,8)	24 (46,6)	6 (10,9)	2 (3,6)	-	-	-	-	Kaneda et al., 2001
	Tailandia	RLFP	153	7 (4,6)	-	138 (90,2)	-	2 (1,3)	-	-	6 (3,9)	-	Thathaisong et al., 2003
	Japón	STS	50	4(8)	-	26 (52)	2(4)	11 (22)	5 (10)	2(4)	-	-	Yoshikawa et al., 2004
	Tailandia	STS	4	1 (25)	-	1 (25)	-	1 (25)	-	-	1 (25)	-	Yoshikawa et al., 2004
	Filipinas	RLFP	12	10 (83)	-	-	-	-	-	-	-	2 (17)	Rivera and Tan, 2005
	China	STS	35	13 (37,1)	2 (5,7)	14 (40)	-	-	-	-	5 (14,3)	1 (2,9)	Yan et al., 2006
	China	STS	192	47 (24,5)	9 (4,7)	116 (60,4)	1 (0,5)	1 (0,5)	-	-	10 (5,2)	8 (4,1)	Li et al., 2007a
	China	STS	78	16 (20,5)	1 (1,3)	55 (70,5)	1 (1,3)	-	-	-	2(2,5)	3 (3,9)	Li et al., 2007b
	Filipinas	SEC	12	4 (33,3)	2 (16,7)	5 (41,7)	-	1 (8,3)	-	-	-	-	Rivera, 2008
	Singapur	RLFP	9	2 (22)	-	7 (78)	-	-	-	-	-	-	Wong et al., 2008
	Malasia	STS	20	9 (45)	1 (5)	10 (50)	-	-	-	-	-	-	Tan et al., 2008
	Malasia	STS	40	5 (12,5)	-	20 (50)	-	11 (27,5)	2 (5)	-	-	2 (5)	Tan et al., 2009
	Tailandia	SEC	77	24 (31)	11 (14)	41 (53)	1 (2)	-	-	-	-	-	Popruk et al., 2015
	Tanzania	SEC	106	36 (34)	28 (26,4)	27 (25,5)	-	-	1 (0,9)	-	-	14 (13,2)	Forsell et al., 2016
	India	SEC	65	6 (9)	-	59 (91)	-	-	-	-	-	-	Das et al., 2016
	Filipinas	SEC	29	9 (31,03)	-	19 (65,5)	1 (3,44)	-	-	-	-	-	Adao et al., 2016
	China	SEC	27	12 (44)	-	15 (56)	-	-	-	-	-	-	Zheng et al., 2017
	Malasia	SEC	191	63 (33)	27 (14)	98 (51)	3 (2)	-	-	-	-	-	Noradiah et al., 2017
	Tailandia	SEC	41	7 (17)	1 (2)	28 (68)	1 (2)	1 (2)	3 (7)	-	-	-	Yowang et al., 2018
	China	SEC	22	7 (32)	-	13 (59)	2 (9)	-	-	-	-	-	Gong et al., 2019
	Tailandia	RLFP	109	34 (31,2)	11 (10,1)	64 (58,72)	-	-	-	-	-	-	Srichaipon et al., 2019
	Indonesia	SEC	43	20 (47)	2 (4)	21 (49)	-	-	-	-	-	-	Kesuma et al., 2019

Anexo 8 Distribución de subtipos de *Blastocystis* sp. por continentes

Continente	País de origen de muestra	Técnica Diagnóstica	Total	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST6 (%)
Oceanía	Australia	SEC	13	5 (38)	-	4 (31)	2 (15)	1 (8)
	Australia	SEC	91	28 (31)	5 (6)	40 (44)	12 (13)	3 (3)

Anexo 9 Frecuencia de subtipos (%) de *Blastocystis* sp. identificados en infecciones humanas en diversos estudios en España

Subtipos	Valencia ^a	Álava ^b	Leganés (Madrid) ^c	Majadahonda (Madrid) ^d	Zaragoza ^e
	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
ST1	1 (1,9)	7 (13,2)	37 (22,8)	1 (3,8)	27 (15,61)
ST2	2 (3,9)	33 (62,3)	59 (36,4)	12 (46,2)	59 (34,1)
ST3		9 (17)	35 (21,6)	4 (15,4)	60 (34,68)
ST4	48 (94,2)	4 (7,5)	30 (18,5)	9 (34,6)	27 (15,61)
ST8	-	-	1 (0,7)	-	-
	51 (100)	53 (100)	162 (100)	26 (100)	173 (100)

^a (Domínguez-Márquez et al., 2009); ^b Paulos et al., (2018); ^c Muadica et al., (2020); ^d (Hernández-Castro et al., 2023); ^ePresente estudio

Anexo 10 Contrato predoctoral financiado por el Gobierno de Aragón



Universidad Zaragoza

MODELO 5R

CONTRATO LABORAL DOCENTE E/O INVESTIGADOR

C.I.F. Q-5018001G

TIPO DE RELACIÓN DE SERVICIOS :
Lab.Doc.Invest.Univ.Durac.Det.

De una parte el Sr. Rector Magnífico de la Universidad de Zaragoza y de otra la persona interesada, cuyos datos figuran posteriormente, ambos con plena capacidad para celebrar el presente contrato, acuerdan la contratación de los servicios de este último en la función que se indica de conformidad con la normativa vigente y las cláusulas generales y particulares que se especifican en este contrato.

Modelo contrato y Exp. UZ: 404 INV PREDOC

DATOS DEL/DE LA TRABAJADOR/A

N.I.P.	Nº SEGURIDAD SOCIAL	NIF / NIE
	501060765502	Y3846496J
PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO	NOMBRE
Matovelle	Ochoa	Cristina Ofelia
SEXO	PAÍS NACIONALIDAD	FECHA DE NACIMIENTO
Mujer	Ecuador	02/04/1986
Lugar de nacimiento	PAÍS	Localidad
Provincia o extranjero	Ecuador	Ecuador
Extranjero	60	218
MUNICIPIO DEL DOMICILIO	PAÍS DOMICILIO	PAÍS O LOCALIDAD
Zaragoza	España	Ecuador
	001	218
		724

DATOS DE LA RELACION DE SERVICIOS

FECHA INICIO CONTRATO	FECHA FIN CONTRATO	CATEGORÍA
01/04/2021	31/03/2022	
CONVENIO		
I.C.C. personal docente e investigador contratado laboral de la UZ-2006		2003
FIGURA CONTRACTUAL		
Personal Investigador en Formación		00121
TÍTULO ACADÉMICO APORTADO	LEGISLACIÓN APLICABLE	
Máster Universitario	CONTRATO DE TRABAJO PREDOCTORAL EN FORMACIÓN, DEL ART. 21 DE LA LEY. 14/2011	404
1073		
PROGRAMA, PROYECTO, CONVENIO, CONTRATO O ACUERDO DE INVESTIGACIÓN ORIGEN DEL CONTRATO		
ORDEN CUS/581/2020, de 26 de junio, por la que se convocan subvenciones destinadas a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2020-2024 (BOA 137 de 13 de julio de 2020)		
ENTIDAD QUE FINANCIÁ EL PROGRAMA DE AYUDA: FINANCIACIÓN: PÚBLICA (X) – PRIVADA ()		
Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón		

DATOS DEL PUESTO / DESTINO

UNIVERSIDAD	ZARAGOZA	1730
AREA DE CONOCIMIENTO	Área de Parasitología	660
DEPARTAMENTO	Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública	L065
CENTRO DE DESTINO PRINCIPAL	Facultad de Medicina	0L05
CENTRO ASISTENCIAL	DEDICACIÓN	JORNADA
	Tiempo completo	C01
PROVINCIA DE CENTRO	LOCALIDAD DEL CENTRO	
Zaragoza	Zaragoza	001

DATOS ECONÓMICOS

RETRIBUCIÓN MENSUAL	PAGAS EXTRAORDINARIAS: No
SUELDO BASE: 1.353,84	NÚMERO: 0
COMPLEMENTOS:	IMPORTE:
TOTAL: 1.353,84	APLICACIÓN PRESUPUESTARIA:
REGIMEN DE SEGURIDAD SOCIAL: GENERAL	Nº DE CUENTA DE COTIZACIÓN: 50/1068338/94

ACTIVIDADES RETRIBUIDAS EN OTROS ENTES PÚBLICOS O PRIVADOS

Ejerce otras actividades en este u otro Ente Público o privado: NO



5127d40f6989722ac78b487e7545b29 Copia auténtica de documento firmado digitalmente. Puede verificar su autenticidad en http://valida.unizar.es/csv/5127d40f6989722ac78b487e7545b29

CSV: 5127d40f6989722ac78b487e7545b29	Organismo: Universidad de Zaragoza	Página: 1 / 2	
Firmado electrónicamente por	Cargo o Rol	Fecha	
CRISTINA OFELIA MATOVELLE OCHOA	La Contratada	11/03/2021 10:12:00	
JOAQUIN ASENSIO MERA	Jefe del Servicio de Personal Docente e Investigador	11/03/2021 12:16:00	
JOSE ANTONIO MAYORAL MURILLO	El Rector	11/03/2021 12:55:00	

Anexo 11 Certificado de aceptación de artículo publicado con el título: Prevalence and Associated Factors of *Blastocystis* sp. Infection in Patients with Gastrointestinal Symptoms in Spain: A Case-Control Study



**Anexo 12 Certificado de participación en el Congreso Europeo de Microbiología Clínica
Enfermedades infecciosas (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious
Diseases: ECCMID 2019)**



**Anexo 13 Certificado de aceptación de paper poster en ECCMID 2019 con el título:
Association of clinical epidemiological profile with the parasitic load of *Blastocystis* spp. in
the north-eastern area of Spain**



Scientific Secretariat
28th ECCMID 2018
c/o ESCMID Executive
Office P.O. Box 214
4010 Basel, Switzerland
eccmid@eccmid.org
www.eccmid.org

Basel, 9th May 2019

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2019

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Amsterdam, Netherlands, 13 – 16 April 2019.

Title: Association of clinical-epidemiological profile with the parasitic load of *Blastocystis* spp. in the north-eastern area of Spain

Abstract Authors: C. Matovelle Ochoa, E. Rubio , P. Goñi, A. Beltrán

Presenter: Cristina Matovelle Ochoa

Session Title: Infectious diarrhoea

Presentation Type: Paper Poster Session

Presentation Number: P0886

Yours sincerely,

Winfried V. Kern
ECCMID 2019 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee: J. Rodriguez-Banó, President, Seville, ES; M. Poljak, Immediate Past-President and Publications Officer, Ljubljana, SI; M. Sanguinetti, President-elect and Secretary General, Rome, IT; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; E. Cambau, Professional Affairs Officer, Paris, FR; E. Tacconelli, Guidelines Officer, Verona, IT; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH; Ö. Ergönül, Education and Communications Officer, Istanbul, TR; Ad hoc Members: Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, IT; L. Leibovici, *CMI* Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

29th
ECCMID

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

ECCMID

Anexo 14 Certificado de aceptación de poster oral en ECCMID 2019 con el título: High genetic heterogeneity of *Blastocystis* spp. in the northeastern area of Spain



Scientific Secretariat
28th ECCMID 2018
c/o ESCMID Executive
Office P.O. Box 214
4010 Basel, Switzerland
eccmid@eccmid.org
www.eccmid.org

Basel, 9th May 2019

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2019

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Amsterdam, Netherlands, 13 – 16 April 2019.

Title: High genetic heterogeneity of *Blastocystis* spp. in the northeastern area of Spain

Abstract Authors: C. Matovelle Ochoa, M. Ubieta, A. Markona, A. Beltrán, A. Clavel, P. Goñi

Presenter: Cristina Matovelle Ochoa

Session Title: Biomarker and molecular diagnosis of parasitic infections

Presentation Type: Mini-oral ePoster Session

Presentation Number: O1207

Yours sincerely,

Winfried V. Kern
ECCMID 2019 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee: J. Rodriguez-Bañó, President, Seville, ES; M. Poljak, Immediate Past-President and Publications Officer, Ljubljana, SI; M. Sanguinetti, President-elect and Secretary General, Rome, IT; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; E. Cambau, Professional Affairs Officer, Paris, FR; E. Tacconelli, Guidelines Officer, Verona, IT; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH; Ö. Ergönül, Education and Communications Officer, Istanbul, TR; Ad hoc Members: Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, IT; L. Leibovici, CMI Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

29th ECCMID

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

ECCMID

Anexo 15 Certificado de aceptación de poster en la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC 2019) con el título: Variabilidad de la cuantificación de *Blastocystis* spp. en muestras fecales de un mismo paciente



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Científico del XXIII Congreso SEIMC 2019, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

C. Matovelle, E. Rubio, P. Goñi, A. Beltran

han realizado la presentación **POSTER** de la comunicación con título:

“Variabilidad de la cuantificación de *Blastocystis* spp. en muestras fecales de un mismo paciente”

en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Madrid, del 23 al 25 de mayo de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid a 25 de mayo de 2019.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

0408

Anexo 16 Certificado de aceptación de poster en ECCMID 2020 con el título: Association between the *Blastocystis* spp. load and patient's socio-demographic and clinical profile in the north-eastern area of Spain



Abstract Book 2020

European Congress of
Clinical Microbiology
and Infectious Diseases

ECCMID



www.eccmid.org
www.escmid.org

Anexo 16 Certificado de aceptación de poster en ECCMID 2020 con el título: Association between the *Blastocystis* spp. load and patient's socio-demographic and clinical profile in the north-eastern area of Spain

Abstracts 2020

Abstract 3997

Association between the *Blastocystis* spp. load and patient's socio-demographic and clinical profile in the north-eastern area of Spain

Cristina Matovelle Ochoa^{1,2}, Encarnación Rubio², Patricia Chueca², Pilar Goñi², Antonio Betran Rosel¹

¹Hospital Clinico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain, ²University of Zaragoza Faculty of Medicine, Zaragoza, Spain

Background: *Blastocystis* spp. is the most prevalent eukaryote parasite found in human feces; however, pathogenicity remains uncertain and it has been associated with the parasitic load. The aim of this study was to assess the relationship between the parasitic load and presence of symptoms.

Materials/methods: A cross-sectional study was designed, including fecal specimens collected from January 1st 2018 to December 31st 2018, at the Microbiology and Parasitology Service of the Hospital Lozano Blesa Zaragoza – Spain. From 6.478 samples, 475 (7.33%) were positive to *Blastocystis* spp., 2 of them from patients who had an incomplete clinical history were excluded; therefore, a total of 473 samples were included in the study. The parasite was identified by optical microscopy (400 x magnification), and 10 fields per sample was considered as "load of *Blastocystis*" variable. To investigate the relationship between the variable load of *Blastocystis* spp. with the socio-demographic and clinical variables and given the non-normality of the distributions, the U Mann-Whitney statistic was used and the level of significance was set at p<0.05.

Results: The analysis of the socio-demographic variables showed that 55.8 % of the patients were men and 44.2% were women, also the median age was 27 years (IR=41). The load of *Blastocystis* spp. by field was significantly higher in patients with abdominal pain (Median = 5.3; IR=10.8 vs 3.6, IR=5.2), chronic diarrhea (Median = 6.6; IR=12.1 vs 4.0, IR=7.9), vomit (Median = 8.6; IR=11.2 vs 4.2, IR=9.3) and aerophagy (Median = 7.0; IR=15.2 vs 4.4, IR=9.0) (table 1). There was not significant relationship between the load of *Blastocystis* spp. by field and the rest of the symptoms.

Conclusions: It was identified that the load of *Blastocystis* spp. by field has a significant association between some symptoms described by the patients as abdominal pain, vomit, chronic diarrhea and aerophagy. The results suggested that *Blastocystis* spp. could behave as a pathogen and its pathogenicity is related with the parasitic load, but further studies are needed to determine the number of *Blastocystis* needed to be considered pathogenic.

Table 1. Relationship between the load of *Blastocystis* and symptoms

	Yes Median (IR)	No Median (IR)	U Mann Whitney	P
Abdominal pain	5.3 (8.8)	3.6 (5.7)	12954.0	0.010
Acute Diarrhea	5.3 (12.0)	4.5 (9.5)	12133.5	0.201
Chronic Diarrhea	6.6 (12.1)	4.0 (7.6)	23062.0	0.002
Nausea	7.0 (16.0)	4.5 (9.3)	8702.50	0.484
Constipation	6.39 (7.7)	4.5 (9.0)	8807.00	0.436
Vomit	8.6 (11.2)	4.2 (9.3)	18877.0	0.001
Anorexia	4.4 (11.7)	4.7 (9.4)	10295.5	0.857
Fatier	7.0 (13.1)	4.5 (9.5)	1224.5	0.107
Aerophagy	7.0 (15.2)	4.4 (9.0)	9427.30	0.020
Anal itching	5.5 (6.3)	4.5 (9.7)	9082.0	0.580
Headache	10.5 (27.2)	4.6 (9.4)	1203.0	0.430
Urinary	4.5 (8.9)	4.6 (9.8)	23095.5	0.771
Wax taste	4.5 (8.4)	4.8 (9.8)	23267.5	0.885
Chest pain	10.7 (14.4)	4.5 (9.4)	2119.0	0.047
Dyspepsia	4.8 (9.4)	4.5 (9.3)	7031.0	0.453

¹U. Mann-Whitney

Presenter email address: crismatovelle@gmail.com

Anexo 17 Certificado de aceptación de poster en la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC 2020) con el título: Las infecciones mixtas por *Blastocystis*, un hallazgo poco frecuente



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC):

CERTIFICA QUE:

C. Matovelle, A. Pascual De Requelme, E. Rubio, M. Ubieto, P. Chueca, A. Beltrán, P. Goñi

Son autores del abstract con título:

Las infecciones mixtas por *Blastocystis*, un hallazgo poco frecuente
(Código del abstract: 361)

Presentado para su publicación en el **LIBRO DE ABSTRAC VIRTUAL SEIMC 2020** editado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en agosto de 2020 (ISBN - 978-84-09-22864-5) y accesible en la web de la SEIMC.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid, a 25 de agosto de 2020.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

Dr. Jordi Vila
Presidente de la SEIMC

Anexo 18 Certificado de aceptación de poster en la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC 2020) con el título: Subtipos de *Blastocystis* spp., sintomatología y morfología del parásito



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC):

CERTIFICA QUE:

C. Matovelle, C. Carrilero, M. Ubieto, P. Chueca, A. Beltrán, P. Goñi, E. Rubio

Son autores del abstract con título:

Subtipos de Blastocystis spp., sintomatología y morfología del parásito
(Código del abstract: 370)

Presentado para su publicación en el **LIBRO DE ABSTRAC VIRTUAL SEIMC 2020** editado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en agosto de 2020 (ISBN - 978-84-09-22864-5) y accesible en la web de la SEIMC.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid, a 25 de agosto de 2020.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

Dr. Jordi Vila
Presidente de la SEIMC

**Anexo 19 Certificado de participación en la tercera conferencia virtual internacional de
Blastocystis (3rd International *Blastocystis* virtual conference)**



THE VIRTUAL EDITION
2nd to 4th of June 2021

This is to certify that

Cristina Matovelle has attended the proceedings of the 3rd International *Blastocystis* Conference which took place virtually from the 2nd to the 4th of June 2021.

Dr. Anastasios Tsaousis
University of Kent
Chair of the Organizing Committee

Anexo 20 Certificado de aceptación de poster en la tercera conferencia virtual internacional de *Blastocystis* con el título: *Blastocystis* spp. subtypes in the north-eastern area of Spain



THE VIRTUAL EDITION
2nd to 4th of June 2021

***Blastocystis* spp. subtypes in the northeastern area of Spain**

Cristina Matovelle^{1,3}, Encarnación Rubio^{1,3}, Patricia Chueca¹, Antonio Beltrán^{2,3}, Pilar Goñi^{1,3}

¹ Department of Microbiology, Pediatrics, Radiology and Public Health. University of Zaragoza-Faculty of Medicine ² Microbiology Service. Clinical Hospital Lozano Blesa, Zaragoza-Spain, ³ Water and Environmental Health Research Group, Environmental Sciences Institute (IUCA), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

Background: A total of 17 subtypes (ST) of *Blastocystis* have been recognized to date, some of them are found in humans (ST1-ST9 and ST12). The aim of the study was to describe the distribution of *Blastocystis* subtypes in the province of Zaragoza, Spain, and the association of these subtypes with symptomatology and the sociodemographic and clinical characteristics of their hosts.

Materials/methods: One hundred and six stool samples, from 81 patients were collected from January 2018 to June 2018 at Lozano Blesa Hospital, Zaragoza-Spain. DNA was extracted using commercial kits. Single and nested PCR techniques were used to amplify a ~500 bp fragment containing highly variable regions of the SSU-rRNA gene, which was sequenced in both directions. Also, associations between subtypes and the host clinical and sociodemographic variables were analyzed using the package SPSS v26.

Results: The median age of the population was 26 years, 53% of them were male. Five different subtypes were identified (Table 1). ST2 was the most prevalent subtype identified; however, ST4 was more frequent in Spaniard patients ($p=0.03$). Patients diagnosed with ST3 had a higher proportion of obesity ($p=0.05$) and dyspepsia ($p=0.08$). Patients harboring the subtype ST4 had a higher proportion of nausea ($p=0.055$) and positive urease test ($p=0.07$). Patients diagnosed with ST3/ST4 had a higher proportion of anorexia ($p=0.048$).

Table 1. Subtype distribution

Subtype	Nº Samples	Nº patients
ST1	13	13
ST2	42	30
ST3	26	23
ST4	15	11
ST1+ST2	3	1
ST1+ST4	3	1
ST2+ST4	2	1
ST4+ST6	2	1

Conclusion A higher prevalence of ST2 and a higher presence of ST4 in the Spaniard population have been found. In addition, mixed infections and associations between *Blastocystis* subtype and some specific gastrointestinal symptoms have been found. To determine the epidemiological implications of these findings, a larger study is underway.

Article

Prevalence and Associated Factors of *Blastocystis* sp. Infection in Patients with Gastrointestinal Symptoms in Spain: A Case-Control Study

Cristina Matovelle ^{1,2}, María Teresa Tejedor ^{3,4,*}, Luis Vicente Monteagudo ^{3,5}, Antonio Beltrán ^{2,6} and Joaquín Quílez ^{5,7}

¹ Faculty of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

² Environmental Sciences Institute (IUCA), University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

³ Department of Anatomy, Embryology and Animal Genetics, Faculty of Veterinary Sciences, University of Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

⁴ Aragon Institute of Health Sciences (IACS), CIBERCV, 50009 Zaragoza, Spain

⁵ AgriFood Institute of Aragon (IA2), 50013 Zaragoza, Spain

⁶ Service of Microbiology and Parasitology, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain

⁷ Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

* Correspondence: ttejedor@unizar.es



Citation: Matovelle, C.; Tejedor, M.T.; Monteagudo, L.V.; Beltrán, A.; Quílez, J. Prevalence and Associated Factors of *Blastocystis* sp. Infection in Patients with Gastrointestinal Symptoms in Spain: A Case-Control Study. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 226. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090226>

Academic Editor: Ana Sanchez

Received: 5 August 2022

Accepted: 1 September 2022

Published: 3 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Blastocystis* sp. is known to be the most prevalent parasite in fecal samples of humans worldwide. In the present report, a case-control study (1:9.89 (≈ 10)) was performed, by analyzing data from 3682 patients who attended a public hospital in the northern area of Spain showing gastrointestinal symptoms. Diagnosis was performed in human fecal samples by means of optical microscopy. The prevalence of *Blastocystis* sp. in patients with gastrointestinal symptoms was 9.18% (338/3682). Most of the *Blastocystis* sp.-infected patients tested negative for protozoa and helminths, and were underweight and foreign-born (26.4%), mainly from Africa and Central/South America. Gastrointestinal symptoms, such as abdominal pain, anorexia, halitosis, plus relative eosinophilia, as well as co-infections with pathogenic bacteria were associated with *Blastocystis* sp. infection. Both type 2 diabetes and treatment with immunosuppressive medicines at the time of *Blastocystis* sp. detection were associated with a higher proportion of infected patients. This is the first case-control study of *Blastocystis* sp. in humans in northern Spain and may contribute to surveillance and intervention strategies by public health authorities.

Keywords: *Blastocystis* sp.; gastrointestinal symptoms; intestinal protozoa; relative eosinophilia; Spain

1. Introduction

Blastocystis sp. is the most prevalent enteric protist reported in human fecal samples [1,2]. Over one billion people are estimated to be infected with *Blastocystis* sp. worldwide, especially in developing countries, where infection frequencies exceeding 50% are commonly reported, and even up to 100% in some tropical countries [3–5]. Conversely, the prevalence is significantly lower in developed countries (10–15%) [6]. The variations in prevalence between studies could be attributed to different factors, including the use of different diagnostic approaches in clinical microbiology laboratories, with many largely underestimating the prevalence in the context of enteric parasite diagnosis [7,8]. Nevertheless, it is well known that the high prevalence of this protist in developing countries is related to socioeconomic factors that lead to poor sanitation and higher potential sources of infection, including human-to-human, zoonotic, and waterborne transmission [9].

Although this parasite was discovered more than a century ago, its pathogenic mechanisms still remain under discussion. Several studies support the pathogenic potential of *Blastocystis* sp. in humans by reporting gastrointestinal symptoms, such as abdominal

pain, diarrhea or vomiting, as well as a diverse spectrum of cutaneous symptoms, mainly urticaria, in the absence of any other cause of sickness identified in patients [10,11]. In contrast, some other studies did not report conclusive evidence for the pathogenic role of *Blastocystis* sp. and consider this protist a common microorganism of healthy intestinal microbiota [12,13]. In the last decade, an increasing number of studies have explored the genetic diversity of *Blastocystis* sp. in humans. A total of 33 different subtypes have been reported to date in humans and animals based on variations in the small subunit ribosomal RNA (SSU-rDNA) gene [14]. However, not all strains of a specific subtype are clinically relevant and a possible correlation between the different subtypes and their pathogenic potential is still strongly debated [15–17].

Multiple risk factors have been reported for *Blastocystis* sp. human infections, including poor hygiene conditions, not washing hands after using toilets, drinking non-tap water and contact with animals [18,19]. The prevalence of the parasite was also correlated with a low socioeconomic status, low education and poor health conditions [20]. Age, nutritional status and some clinical conditions (anemia, irritable bowel syndrome) have also been linked to *Blastocystis* sp. infections [19,21]. In European countries, travelling abroad or infections with other enteric parasites significantly increase the risk of having a positive result for *Blastocystis* sp [17,22,23].

In Spain, studies on the prevalence and risk factors of *Blastocystis* sp. infection in humans are limited and mostly focused on specific groups of the population. Studies in asymptomatic and symptomatic children have revealed prevalence rates of 5.3–19.4% using microscopy and/or PCR-based techniques, and up to 27.8% of adult patients tested positive for *Blastocystis* sp. using both diagnostic methods [24–27]. Adult age, working with the public, being African and travelling to other countries have been reported to significantly increase the risk of having a positive diagnosis of *Blastocystis* sp., while good hygiene practices, such as hand or vegetable washing, have been recommended to minimize the risk [23,26,28,29]. Few studies in Spain have analyzed the relationships of this parasite with the presence of digestive symptoms, which was not found as a significant factor in patients older than 18 years [23]. The current case–control study was aimed to analyze the prevalence of *Blastocystis* sp. in patients of different age groups with gastrointestinal manifestations in northern Spain. In addition, co-infection of *Blastocystis* sp. and other species of pathogenic bacteria, helminths and protozoa were analyzed. Multiple variables, including anthropometric, socio-demographic and clinical data, were analyzed as potential associated factors with *Blastocystis* sp. infection.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Approval Statement

The present study was performed following the guidelines of the Declaration of Helsinki in 1975, revised in 2013. All procedures performed in this study were approved by the Ethics Committee of Aragón (ref 18/081) before undertaking this research to confirm that the study meets national and international guidelines. A signed informed consent was obtained from every participating patient before they participated in the study, and patients were completely anonymized by the researchers. All the authors ensure that this study is HIPAA (Health Insurance Portability and Accountability Act, 1996) compliant. The researchers followed every mandatory (health and safety) procedure.

2.2. Study Population

The study was conducted using fecal specimens from patients with gastrointestinal illness submitted for microbiological and parasitological diagnosis to the Microbiology and Parasitology Department of the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) in 2018. This is a public hospital that cares for a combined urban and rural population of more than 274,000 citizens in Zaragoza. Increasing immigrations rates have been reported in this sanitary area in the last few years. Individuals born in foreign countries, mainly from tropical and subtropical regions, and those that have access to the Spanish universal health

coverage were also included in this study. Overall, 6087 specimens from 3682 patients were analyzed for both stool culture and parasitological diagnosis from 1 January 2018 to 31 December 2018. Patients were defined as cases if they tested positive for *Blastocystis* by microscopy and patients with negative results were defined as controls. The mean age of the individuals selected as cases and controls was 30.18 ± 1.294 years (range: 1 to 100 years).

Demographic, anthropometric and medical variables from all patients were obtained using (1) the Modulab[®] Werfen Gold version 2.0 laboratory computer program (Werfen Spain, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain), and (2) the Intranet electronic program (website of the Aragón Healthcare Service). The categorical variables analyzed for association with *Blastocystis* sp. infection were as follows:

- Demographic origin: Spain, rest of Europe, Africa, America and Asia;
- Age group: ≤ 16 years and > 16 years;
- Sex: male and female;
- Categorized body mass index (BMI): underweight (< 18.4 Kg/m²), normal weight (18.5–24.9 Kg/m²), overweight (25–29.9 Kg/m²) and obesity 30– > 40 Kg/m²;
- Immunosuppressive treatment: chemotherapy, monoclonal antibodies, antiretroviral drugs, nucleoside analogs, corticosteroids;
- Gastrointestinal symptoms: diarrhea, abdominal pain, nausea, vomiting, constipation, anorexia, fever, aerophagia, halitosis, urticaria, anal itching and dyspepsia;
- Co-morbidities: celiac disease (CD), type 2 diabetes, IBS (irritable bowel syndrome) and cancer;
- Laboratory parameters: glucose (normal range: 82–115 mg/dL), glycosylated hemoglobin (normal range: 4.6–5.7%), hemoglobin (normal range: 12–15.3 g/dL) and relative eosinophilia (percentage of eosinophils on total leukocyte count, normal range: 2–10%);
- Co-infection with pathogenic bacteria or other enteric protozoa or helminths.
- Age and BMI were also analyzed as continuous variables.

It should be noted that some of these variables were not available for all positive patients.

2.3. Stool Examination

The standard procedure for *Blastocystis* sp. diagnosis in the Clinical Microbiology and Parasitology laboratory in the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa was applied. Briefly, fecal specimens were concentrated by the SAF (sodium acetate-acetic acid-formalin) sedimentation method and examined by light microscopy. Three stool wet-mount preparations for each fecal specimen were evaluated for the presence of *Blastocystis* sp., as well as protozoa and helminths. The entire preparations from left to right and from top to bottom were examined with 10 \times and 40 \times optical objective lenses. Diagnosis of *Blastocystis* sp. was based on the morphology of the parasites observed in the preparation [1,30]. The Ziehl-Neelsen modified technique was used to screen for *Cryptosporidium* oocysts. Those patients that submitted repeated fecal samples on days 1-3-5 were considered positive for *Blastocystis* sp. if any of the samples were positive.

Furthermore, optical microscopic examination detected several microorganisms, such as Protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba* spp., *Encephalitozoon hellem*, *Entamoeba* spp., *Giardia lamblia* and *Isospora belli*), and Helminths (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma intercalatum*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata* and *Trichuris trichiura*) [30].

For the microbiological stool analysis, samples were cultured using Hektoen agar (Biomérieux[®], Hazelwood, MO, USA), Mac Conkey (Biomérieux[®], Hazelwood, MO, USA), CCDA agar (Biomérieux[®], Hazelwood, MO, USA), and selenite broth with reseeded on Hektoen after incubation for 16 h. In patients with blood in the samples, seeding in Mac Conkey/sorbitol agar was added. Incubations were carried out at 37 °C, except for CCDA agar, which was incubated at 45 °C in anaerobiosis [31]. MALDI-TOF MS was used to

identify bacteria at the species level (*Campylobacter* sp., *Arcobacter butzleri*, *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp., *Escherichia coli*) [32].

2.4. Data Analysis

Statistical analyses were carried out using the IBM SPSS Statistics 26.0 software package (IBM Corp., Armonk, NY, USA). For categorical variables, proportions and percentages were calculated; Pearson's chi-squared (with continuity correction for 2×2 tables) or, alternatively, Fisher's exact test (expected number < 5) was used for comparisons between the case and control groups. For multiple comparisons (more than two categories), Bonferroni correction was used. Age (years), BMI (kg/m^2) and blood parameters (concentrations of glucose, glycosylated hemoglobin and hemoglobin and relative eosinophilia) were submitted to the Shapiro–Wilks test to assess their normal distribution. Age was summarized by mean and SE, while the median and interquartile range (IQR) were used to summarize the rest of quantitative variables. T-test was used for comparing ages between the cases and controls, while the Mann–Whitney U test was applied for comparisons involving the rest of the quantitative variants. p values < 0.05 were considered as statistically significant.

Twenty-one variables are considered in the study of co-infections (20 variables for pathogenic bacteria, helminths and protozoa, plus 1 variable for *Blastocystis*). They were categorical variables, codified as 0 and 1 (absence or presence of a particular pathogen, respectively). Principal component analysis (PCA) was used to reduce a large set of variables for co-infections into a smaller set of variables (principal components), accounting for most of the variance in the original variables; PCA provided a basis of statistical significance to the presence of two or more microorganisms in the same individual. Microorganisms present only in few individuals or those that lacked a relationship with each other were eliminated from the study; the co-infection in these cases could be merely a fortuitous event. The KMO index (Kaiser–Meyer–Olkin index) measures the linear relationship between the variables; the KMO index for a particular variable must be > 0.5 for that variable to be considered for the PCA [33]. The eigenvalue-one criterion [34] and the scree plot [35] were used in order to decide the number of components to be retained. Orthogonal rotation (varimax) was chosen. Since we are interested in grouping individuals on the basis of co-infections, a cluster analysis was applied on the retained principal components. Initially, a hierarchical agglomerative procedure was used, creating the clusters by means of Ward's method to define the number of clusters by the elbow rule. Then, the k-means procedure was used to form the clusters [36]. These clusters are groups of individuals that share similar characteristics about co-infections (or absence of co-infections); hence, the parasitic characteristics of these clusters can be interpreted as the most interesting co-infections (or absence of co-infections), based on their frequencies and the significant association of the involved parasites.

Those variables that showed significant differences between the cases and controls were chosen for logistic regression analysis. The association of these variables (independent variables) with case/control status (dependent dichotomous variable; value labels: case = 1, control = 0) was ascertained by binomial logistic regression. The model was adjusted using a stepwise procedure (method: forward; Wald test); the significance levels for the variables to enter and to be removed were $p \leq 0.05$ and $p \geq 0.10$, respectively [37]. Nagelkerke R^2 was used to estimate how much variation in the dependent variable can be explained by the model. The model's ability to discriminate between cases and controls was assessed by its accuracy parameters, which were as follows: sensitivity (Sn: true positive rate), specificity (Sp: true negative rate), positive and negative predictive values (PPV and NPV: proportions of positive and negative results in diagnostic tests that are true positive and true negative results, respectively) [38]. The overall measure of discrimination was represented by the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve [39]. The 95% confidence interval (95% CI) was estimated for both accuracy parameters and area under the ROC curve.

3. Results

Fecal specimens from 338 of 3682 patients (9.18%) tested positive for *Blastocystis* sp. infection and were included as cases. Figure 1 shows a microscope field obtained in a *Blastocystis* positive sample.

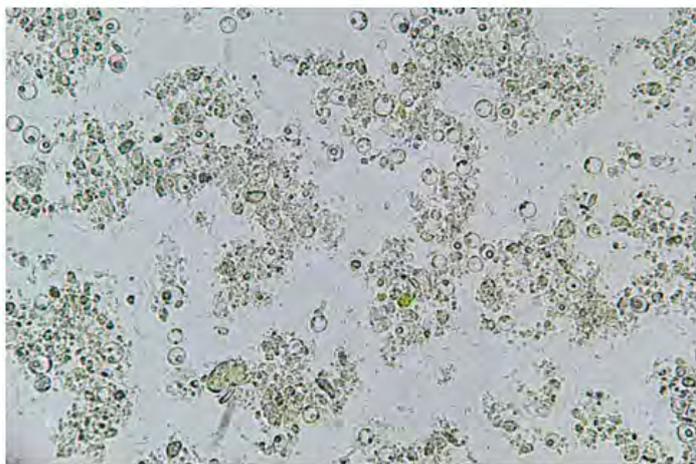


Figure 1. Microscope field image (100× magnification) obtained in a sample from an infected *Blastocystis* patient with high parasite load.

The control group consisted of 3344 patients negative for this parasite. The case-control ratio group was 1: 9.89 (≈ 10). Table 1 shows the distribution of the demographic/anthropometric parameters and treatment with immunosuppressive drugs in positive and negative *Blastocystis* sp.-infected patients. Most of the variables showed statistically significant differences between the cases and controls. In relation to the geographical origin, the percentage of patients from Spain was significantly lower in the cases than in the controls, while the situation was reversed in the patients from other countries, with significant differences in those from Africa, America (Central and South America, plus one *Blastocystis* negative patient from USA). When age was categorized based on a 16 years cut-off (child vs. adult), no significant difference was detected between cases and controls; in contrast, the cases were significantly younger than controls when age was considered as a quantitative variable. Underweight individuals were significantly more common in the cases than in controls; in contrast, both normal weight and overweight persons were significantly more frequent in the controls. The BMI as a quantitative variable also differed significantly between cases and controls, with lower values in the cases. Immunosuppressive treatment with chemotherapy, monoclonal antibodies or antiretroviral drugs were significantly more common in the cases than in controls, but treatment with corticosteroids was more frequent in the controls. Sex and proportion of patients undergoing treatment with nucleoside analogs did not differ between cases and controls.

Table 1. Distribution of demographic/anthropometric parameters and immunosuppressive treatment in cases (*Blastocystis*-positive patients) and in controls (*Blastocystis*-negative patients).

Variable	<i>Blastocystis</i> -Positive Patients	<i>Blastocystis</i> -Negative Patients	p-Value
Geographical origin			<0.001
Spain	215/337 (63.8%) ^a	2712/3343 (81.1%) ^b	
Rest of Europe	33/337 (9.8%) ^a	267/3343 (8.0%) ^a	
Africa	48/337 (14.20%) ^a	165/3343 (4.9%) ^b	
America	30/337 (8.9%) ^a	144/3343 (4.3%) ^b	
Asia	11/337 (3.3%) ^a	55/3343 (1.6%) ^b	
Age groups			0.140
≤16 years	148/338 (43.8)	1321/3344 (39.5%)	
>16 years	190/338 (56.2%)	2023/3344 (60.5%)	
Sex			0.125
Male	180/338 (53.3%)	1629/3344 (48.7%)	
Female	158/338 (46.7%)	1715/3344 (51.3%)	
Categorized BMI			<0.001
Underweight (<18.4)	95/276 (34.4%) ^a	266/2349 (11.3%) ^b	
Normal (18.5–24.9)	92/276 (33.3%) ^a	939/2349 (40%) ^b	
Overweight (25–29.9)	55/276 (19.9%) ^a	891/2349 (37.9%) ^b	
Obesity 30-> 40	34/276 (12.3%) ^a	253/2349 (10.8%) ^a	
Immunosuppressive treatment			
Chemotherapy	6/337 (1.8%)	1/3344 (0%)	<0.001
Monoclonal antibodies	3/337 (0.9%)	0/3344 (0%)	0.001
Antiretroviral drugs	3/337 (0.9%)	0/3344 (0%)	0.001
Nucleoside analogs	1/337 (0.3%)	47/3344 (1.4%)	0.124
Corticosteroids	3/337 (0.9%)	965/3344 (28.9%)	<0.001
Age (years) *	30.18 ± 1.294	36.11 ± 0.511	<0.001
BMI (Kg/m ²) *	21.21 (9.51)	24.89 (5.10)	<0.001

* Quantitative variable. Data are reported as counts (%), except for age (years), which is described as the mean ± SE, and for BMI (kg/m²), which is summarized as median and interquartile range (IQR). ^{a,b}: Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.050$.

The clinical symptoms, underlying diseases, co-infections with pathogenic bacteria or other enteric parasites and laboratory test results in the cases and controls are summarized in Table 2. Most symptoms were significantly more common in the cases than in controls, including abdominal pain, nausea, anorexia, aerophagia, halitosis, urticaria, anal itching and dyspepsia. In contrast, the presence of diarrhea, and fever was more common in the controls than in cases, with statistically significant differences in the presence of fever. No significant differences were detected between the groups for the co-morbidities, except for type 2 diabetes, which was more frequent in the cases, while irritable bowel syndrome (IBS) was significantly more common in negative patients. There was no difference in biochemical parameters between *Blastocystis* sp.-infected and uninfected patients. However, highly significant differences were found for relative eosinophilia, showing greater values in the cases.

Table 2. Clinical symptoms, co-morbidities, co-infections, and hematological/biochemical parameters in cases (*Blastocystis*-positive patients) and in controls (*Blastocystis*-negative patients).

Variables	<i>Blastocystis</i> -Positive Patients	<i>Blastocystis</i> -Negative Patients	p-Value
Clinical symptoms			
Diarrhea	166/336 (49.4%)	1797/3344 (53.7%)	0.144
Abdominal pain	275/336 (81.8%)	975/3344 (29.2%)	<0.001
Nausea	36/336 (10.7%)	29/3344 (0.9%)	<0.001
Vomiting	47/336 (14%)	446/3344 (13.3%)	0.803
Constipation	24/336 (7.1%)	323/3344 (9.7%)	0.160
Anorexia	34/336 (10.1%)	27/3344 (0.8%)	<0.001
Fever	18/336 (5.4%)	972/3344 (29.1%)	<0.001
Aerophagia	39/336 (11.6%)	53/3344 (1.6%)	<0.001
Halitosis	5/336 (1.5%)	4/3344 (0.1%)	0.001
Urticaria	103/336 (30.7%)	202/3344 (6%)	<0.001
Anal itching	32/336 (9.5%)	90/3344 (2.7%)	<0.001
Dyspepsia	27/336 (8%)	88/3344 (2.6%)	<0.001
Co-morbidities			
Celiac disease	8/336 (2.4%)	48/3344 (1.4%)	0.264
Type 2 diabetes	59/309 (19.1%)	182/3344 (5.4%)	<0.001
IBS	6/336 (1.8%)	160/3344 (4.8%)	0.017
Cancer	18/336 (5.4%)	194/3344 (5.8%)	0.833
Co-infections			
Pathogenic bacteria	30/336 (8.9%)	6/3344 (0.2%)	<0.001
Helminths	22/336 (6.5%)	22/3344 (0.7%)	<0.001
Protozoa	25/336 (7.4%)	72/3344 (2.2%)	<0.001
Laboratory parameters			
Glucose *	87.00 (14.0)	87.00 (14.0)	0.379
Glycosylated hemoglobin *	5.70 (1.0)	5.50 (0.9)	0.523
Hemoglobin *	14.10 (1.80)	14.10 (2.50)	0.903
Relative eosinophilia *	3.20 (4.5)	0.10 (0.1)	<0.001

* Quantitative variable. Data are reported as counts (%) except for quantitative variables, which are described as median and interquartile range (IQR).

Several variables related to the absence/presence of pathogens were not included in the PCA, whose results are described in Table 3. Namely, a very low number of individuals (<2) showed presence of *Arcobacter butzleri*, *Shigella*, *Schistosoma intercalatum*, *Taenia saginata* and *Encephalitozoon hellem*; therefore, these variables were not considered for PCA. Several variables had a KMO index <0.5, breaching the basic assumption for PCA (*Aeromonas* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Hymenolepis nana* and *Trichuris trichiura*). Hence, only *Isoospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Dientamoeba*, *Entamoeba* sp., *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* and *Blastocystis* sp. were considered for PCA. Based on the criteria explained in the statistical methodology, three principal components were retained. The cumulative percentage of variance explained by them was 46.996%.

Table 3. Rotated component matrix: loadings of principal components 1, 2 and 3 on variables related to the absence/presence of pathogens. Coefficients below 0.3 (absolute value) have been suppressed for easier interpretation.

Parasite	Principal Component		
	1	2	3
<i>Isoospora belli</i>	0.710		
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0.601	−0.433	
<i>Giardia lamblia</i>	0.594		
<i>Dientamoeba</i> sp.	0.429		
<i>Entamoeba</i> sp.		0.647	
<i>Ascaris lumbricoides</i>		0.619	
<i>Enterobius vermicularis</i>			0.801
<i>Blastocystis</i> sp.		0.308	0.607

Table 3 shows the rotated component matrix (the key output of PCA); it shows the estimates of the correlation coefficients between each of the original variables and the estimated components. Hence, PCA summarizes the information about co-infection from the original 21 variables in only 3 variables (three principal components; 1, 2 and 3), including the original variables shown in Table 3. The coefficients below 0.3 (absolute value) have been suppressed for easier interpretation. Positive loadings indicate that a variable and a principal component are positively correlated; an increase in one results in an increase in the other. Negative loadings indicate a negative correlation. Large (either positive or negative) loadings indicate that a variable has a strong effect on that principal component. Principal component 1 loads very strongly on *Isoospora belli*, *Strongyloides stercoralis* and *Giardia lamblia* but less strongly on *Dientamoeba* sp.; this principal component mainly summarizes the information about the presence of these four agents. Similarly, principal component 3 loads very strongly on *Enterobius vermicularis* and less strongly on *Blastocystis* sp. Finally, principal component 2 loads strongly on *Entamoeba* spp and *Ascaris lumbricoides*, but lightly on *Blastocystis* sp. and *Strongyloides stercoralis* (negative load); this principal component summarizes the information about the presence of *Entamoeba* spp and *Ascaris lumbricoides*, and *Blastocystis* and the absence of *Strongyloides stercoralis*.

Once the original variables set was reduced by PCA, cluster grouping based on the three retained principal components must be applied in order to study co-infections. These clusters are groups of individuals that share similar characteristics, as it refers to the variables included in the three principal components; hence, this provides a simplified view of the most relevant co-infections in the considered sample of individuals. Table 4 shows the result of the clustering based on the three retained principal components. The first cluster included most of the individuals that were negative for *Blastocystis* sp. (3277/3344 = 98%), while the sixth cluster contained the majority of the *Blastocystis* sp. positive patients (301/336 = 89.50%), with no presence of other parasites in either cluster. Hence, most of the studied individuals, either cases or controls, did not show any co-infection. Each cluster of individuals concerned a particular microorganism, since most of the individuals that showed this microorganism are included. Cluster 2 concerned *Giardia lamblia* (45/52 individuals infected with *Giardia* = 86.53%) and included only 9 of the 336 patients infected with *Blastocystis* sp. (2.68%). Cluster 3 included all patients infected with *Enterobius vermicularis* (n: 16) and included eight patients positive for *Blastocystis* sp. (2.38%). Cluster 4 contained all patients infected with *Entamoeba* sp. (n: 19) and included twelve patients positive for *Blastocystis* sp. (3.57%). Finally, all patients infected with *S. stercoralis* were allocated to Cluster 5 (n: 6), which also included six *Blastocystis* sp.-infected patients (1.78%). The Table 4 shows the results obtained for all the kinds of co-infections. Since this study focuses on *Blastocystis*, Table 5 provides a more accurate description of co-infections, including more than one microorganism, in addition to *Blastocystis*.

Table 4. Characteristics of individuals included in the 6 clusters obtained in the study. Absence or presence of a particular pathogen was recorded as 0 and 1, respectively.

Cluster	Frequency	<i>Ascaris lumbricoides</i>		<i>Dientamoeba sp.</i>		<i>Strongyloides stercoralis</i>		<i>Entamoeba sp.</i>		<i>Enterobius vermicularis</i>		<i>Giardia lamblia</i>		<i>Isoospora belli</i>		<i>Blastocystis sp.</i>	
		0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
1	3277/3680 (89%)	3277		3277		3277		3277		3277		3277		3277		3277	
2	53/3680 (1.4%)	53		45	8	53		53		53		8	45	53		44	9
3	16/3680 (0.4%)	16		16		16		16		16	16	16		16		8	8
4	23/3680 (0.6%)	18	5	22	1	23		4	19	23		21	2	22	1	11	12
5	10/3680 (0.3%)	10		9	1	4	6	10		10		5	5	5	5	4	6
6	301/3680 (8.2%)	301		301		301		301		301		301		301		301	301
Total	3680	3675	5	3670	10	3674	6	3661	19	3664	16	3628	52	3674	6	3344	336

Table 5. Description of the number of patients with Blastocystosis and co-infections included in each cluster, except cluster 1 (only controls) and cluster 6 (patients carrying exclusively *Blastocystis*).

Cluster Number	Patients Infected with <i>Blastocystis sp.</i>	Patients with Co-Infection	Co-Infection
2	9	4/336 (1.2%) 5/336 (1.5%)	<i>Giardia lamblia</i> <i>Dientamoeba sp.</i>
3	8	8/336 (2.4%)	<i>E. vermicularis</i>
4	12	6/336 (1.8%) 1/336 (0.3%) 4/336 (1.2%) 1/336 (0.3%)	<i>Entamoeba sp.</i> <i>Entamoeba sp./G. lamblia</i> <i>A. lumbricoides</i> <i>A. lumbricoides/Dientamoeba sp./Entamoeba sp./G. lamblia/I. belli</i>
5	6	4/336 (1.2%) 1/336 (0.3%) 1/336 (0.3%)	<i>G. lamblia/I. belli</i> <i>S. stercoralis/I. belli</i> <i>Dientamoeba sp./S. stercoralis/I. belli</i>

Table 6 shows the final model for binomial logistic regression; it was statistically significant ($\chi^2(11) = 1955.696; p < 0.001$) and explained 94.6% of the total variance (Nagelkerke R^2). The probability of being infected with *Blastocystis sp.* was similar for individuals from both Spain and the rest of Europe, but significantly increased for individuals from America and especially from Africa. No significant association was detected for individuals from Asia, which may be due to their scarcity. Abdominal pain, anorexia and type 2 diabetes were significantly associated with *Blastocystis sp.* detection, but corticosteroid treatment was associated with the absence of this microorganism. Infection was strongly associated with the presence of pathogenic bacteria and halitosis; namely, individuals with bacterial co-infection were 132.960 times more likely to be infected with *Blastocystis sp.* and this likelihood increased to 315.220 times more when halitosis was detected. However, the strongest association corresponded to relative eosinophilia; as relative eosinophilia increased by 1 unit, the likelihood for *Blastocystis sp.* infection increased 1105.260 times. The accuracy parameters for the binomial logistic regression model were high and were as follows: Sn = 0.967 (95% CI: 0.969–0.998); Sb = 0.998 (95% CI: 0.996–0.998); PPV = 0.983 (95% CI: 0.968–0.997); NPV = 0.997 (95% CI: 0.995–0.999). The area under the ROC curve was 0.997 (95% CI: 0.993–1.000; $p > 0.001$).

Table 6. Final model for binary logistic regression, showing the significant associations of blastocystosis to patient's origin, presence of pathogenic bacteria, abdominal pain, anorexia, halitosis, type 2 diabetes and corticosteroid treatment, and relative eosinophilia (quantitative variable).

Variable	B	SE	Wald	df	p-Value	Odds Ratio (OR)	95% CI for Odds Ratio	
							Lower	Upper
Geographical origin			9.205	4	0.056			
Rest of Europe	−0.141	0.918	0.024	1	0.878	0.868	0.144	5.250
Africa	2.025	0.810	6.249	1	0.012	7.574	1.548	37.046
America	1.828	0.873	4.391	1	0.036	6.223	1.125	34.411
Asia	0.726	1.629	0.199	1	0.656	2.067	0.085	50.360
Pathogenic bacteria	4.890	1.367	12.804	1	<0.001	132.960	9.130	1936.310
Abdominal pain	2.568	0.576	19.901	1	<0.001	13.041	4.220	40.300
Anorexia	3.135	0.943	11.055	1	0.001	22.999	3.623	146.016
Halitosis	5.753	1.632	12.433	1	<0.001	315.220	12.875	7717.767
Type 2 diabetes	2.021	0.722	7.837	1	0.005	7.547	1.833	31.070
Corticosteroids treatment	−5.998	1.574	14.514	1	<0.001	0.002	0.000	0.054
Relative eosinophilia	7.008	0.658	113.374	1	<0.001	1105.260	304.259	4014.997
Constant	−9.487	0.831	130.250	1	<0.001	0.000		

B: regression coefficient; SE: standard error; df: degrees of freedom; 95% CI: 95% interval of confidence.

4. Discussion

Blastocystis sp. is among the most prevalent parasites found in human fecal specimens in diagnostic microbiology laboratories, although its clinical significance is still uncertain in contrast to common protozoa, which are responsible for a significant proportion of diarrheal morbidity globally, such as *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* sp. [40–42]. In Spain, previous studies in patients that reported digestive disorders and attended medical services have shown that the percentage of patients infected with *Blastocystis* sp. is twice or even ten times higher than those infected with *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* sp., respectively [28]; however, studies in asymptomatic children have reported similar infection rates for *Blastocystis* sp. and *G. duodenalis* [26].

The prevalence of *Blastocystis* sp. infection in patients with gastrointestinal symptoms in this study was 9.18%. This result is consistent with previous studies in central Spain using conventional microscopy, which have documented prevalence rates of 9.6% in HIV-positive children and 5.3–19.4% in children attending daycare centers and primary schools [24,25], while 13% was found in asymptomatic school children using PCR-based methods [26]. Higher prevalence rates have been reported in adult patients in Catalonia (northeastern Spain) through microscopic examination and PCR (27.8%) [27], and up to 35.2% of PCR-*Blastocystis* positive samples were found in humans sharing households with dogs and cats in northern Spain [43]. In Europe, the prevalence of this protist has been reported to range from 3% to 7% in France, Italy and the United Kingdom using direct-light microscopy, but higher rates (14.5–24.2%) were found using PCR-based methods in France, the Netherlands and Denmark [22,28,44–47].

It is significant to mention that the infection rates detected in this study may be an underestimation, since molecular analyses are known to be much more sensitive than microscopic techniques and xenic in vitro culture for the detection of *Blastocystis* sp. in fecal specimens from both humans and animals [1,45]. Culture from stool samples was significantly more sensitive than direct microscopic examination, but it is time consuming and not practical for diagnosis when a quick turnaround is required [45]. The sensitivity of microscopy has been suggested to increase when increasing the number of investigated samples. Microscopy on two SAF (sodium acetate-acetic acid-formalin) preserved samples in the test called “triple faeces test”, which combines multiple fecal sampling (on 3 consecutive days) with a concentration method, has been reported to provide a similar sensitivity to sequence confirmed-PCR [47,48]. In contrast, other studies have shown that microscopic di-

agnosis through a concentration technique did not increase when two or three consecutive stool samples were investigated, compared with one simple stool investigation [49].

Geographical location has been reported to influence the prevalence of parasitic infections [50]. In this study, a significant effect of geographic origin of patients on the prevalence of *Blastocystis* sp. was found, with over 25% of infected patients originating from outside Europe, with the percentage of patients from Central and South America, and especially from Africa, being significantly higher in the cases than in controls. Poor sanitary and hygiene conditions have been proposed to explain the higher prevalence of *Blastocystis* sp. in low-income countries, since it is mainly transmitted through the fecal-oral route via consumption of contaminated food or water [3]. Infection rates ranging from 80.4% to 100% have been documented in school children in Senegal, 64% in Moroccan children, 71.1% in immigrant workers in Qatar, 78% in the Guinean population, and 63% in children in Lebanon [4,51–55]. In contrast, much lower rates are documented from European countries, including Denmark (5.6%), France (13.7–23.1%), Czech Republic (24%) and Spain (13%) [22,29,56,57].

In this study, the presence of *Blastocystis* sp. was not associated with either of the two age classes (children or adults) or with sex, although the cases were significantly younger than controls when age was considered as a quantitative variable. Many studies in different parts of the world have investigated the effect of host sex on *Blastocystis* sp. infection rates and most of them have shown that prevalence is not significantly related to sex [57–59], although some studies have shown a higher prevalence in either females [60] or males [61]. Similarly, there are contradictory results regarding the association with host age. Some studies found no significant relationship [21,59,62], but others reported higher *Blastocystis* sp. infection rates among younger adult age groups [22,23], adults aged more than 18 years [61] or even older than 60 years [63]; other studies have documented patients younger than 30 years or children in the group of age 5–15 years to have a higher risk of being infected with *Blastocystis* sp. [43,55].

Our results for BMI showed a highly significant difference between the groups of patients, with underweight individuals being significantly more common among the cases than in controls. This finding is consistent with previous studies that claimed a positive correlation between low BMI and *Blastocystis* sp. infection, an observation which has been related to a potential negative effect of the protist on dietary intakes and energy metabolism [42,64,65]. This potential negative impact on host weight could be of relevance when considering data that suggest that *Blastocystis* sp. is capable of long-term host colonization, with some individuals testing positive for up to 10 years [12].

Another potential factor that determines the transmission of pathogens is host immunity, since it is well known that patients with decreased immunity are particularly susceptible to opportunistic infections [66]. *Blastocystis* sp. has been widely reported in both immunocompetent and immunocompromised individuals but its pathogenic, or rather opportunistic, role has yet not been clearly elucidated. Recent systematic reviews and meta-analyses have estimated that the global pooled prevalence rate of this protist in immunocompromised patients is around 10% [67], and case-control studies have shown that immunosuppressive conditions, such as cancer, organ transplantation and hemodialysis, were associated with higher odds of infection [68]. In contrast, similar or even lower prevalence was reported in some studies on immunodeficient patients compared to controls [23]. In this study, immunosuppressive treatments with chemotherapy, monoclonal antibodies or antiretroviral drugs were more common in cases than in controls, which could support the role of *Blastocystis* sp. as an opportunistic organism. However, it is worth mentioning that treatment with corticosteroids was much more frequent in controls than in cases (28.9% compared to 0.9%), and the use of these immunomodulatory drugs was also significant as a potential protective factor in the model for binary logistic regression. The reason for this observation is not known; in fact, a recent study on patients with inflammatory bowel disease showed no clear association between the presence of *Blastocystis* sp. or the use of corticosteroids [69].

In this study, type 2 diabetes was significantly more frequent in cases and this metabolic disease was also a significant factor in the binary logistic regression. Most studies have also reported patients with diabetes mellitus to be at higher risk of infection, which has been related to a weakened immune system [70]. The presence of diabetes mellitus increased the risk of *Blastocystis* sp. infection more than 9 times in patients with irritable bowel syndrome in Egypt [71], although previous studies in Spain found no correlation among these factors [23]. In contrast, our results do not support *Blastocystis* infection to be a risk factor for irritable bowel syndrome, which was even more common among controls than in cases. The implication of *Blastocystis* sp. in the development of IBS is controversial, although some studies have indicated a positive association and suggested that accurate diagnosis of this protist should be included in the clinical protocol of IBS patients [72].

The odds ratio for halitosis, pathogenic bacteria and relative eosinophilia shows very high values. When both the odds of achieving an outcome, if exposed (presence of *Blastocystis*, cases) and if not exposed (absence of *Blastocystis*, controls), are very low, but odds in controls are even lower than odds in cases, high values for OR are found. However, 95% confidence intervals are very wide, pointing to a low confidence in the obtained OR values. Therefore, these high OR values found for halitosis, pathogenic bacteria and relative eosinophilia suggest that these factors are associated with *Blastocystosis*, but one must take into account that these OR values may be overestimated, due to the low frequencies of these outcomes in the whole sample of cases and controls.

Relative eosinophilia has been associated with *Blastocystis* sp. infection in this study. In parasitic diseases, blood eosinophilia is usually associated with helminth infections, especially coinciding with the larval migration through tissues, and travelers/immigrants from resource-limited countries, who are most likely to acquire these infections, have been reported to have a high likelihood of eosinophilia. However, it is usually considered uncommon for an eosinophilia to be produced by protozoan infections [73]. Few studies have reported a high proportion of eosinophils in the peripheral blood of symptomatic patients infected with *Blastocystis* sp. [74], but our results indicate that patients with relative eosinophilia are more likely to be infected, suggesting that eosinophilia should be taken into consideration in the diagnosis of *Blastocystis* sp. infection.

Human gut microbiota composition is considered a deciding agent in the pathogenicity and occurrence of *Blastocystis* sp., and the alteration of the intestinal environment provoked by pathogens has been suggested to be involved in its pathogenicity [15]. In healthy children, Kodio et al. (2019) [75] concluded that *Blastocystis* sp. colonization is associated with a higher diversity of the bacterial communities in the gut but is not associated with the presence of potentially pathogenic bacteria in the human gut. As higher bacterial diversity is commonly associated with health and lower incidence of inflammatory diseases, it has been suggested that *Blastocystis* colonization is associated with a healthy gut microbiome [76]. In this study, the cluster analysis showed that this protist was by far the most frequently detected intestinal parasite, and most patients infected had no presence of other helminths or protozoa included in the principal component analysis; however, co-infections with pathogenic bacteria or enteric parasites were much more common among cases than controls, which suggest that they are associated with *Blastocystis* sp. presence. These findings contrast with the observations of Hidalgo et al., (2019) [23] who suggested that the presence of other parasites significantly decreased the risk of positive detection of *Blastocystis* sp., although the authors indicated that there could be evidence of bias in the study because all the participants were patients submitted for parasitological diagnosis.

Whether *Blastocystis* sp. is a pathogen or a commensal of the human gut is still uncertain. Studies on healthy, randomly sampled individuals have shown a high presence of *Blastocystis* sp. and a prolonged colonization of the gut, but others have implicated it in intestinal diseases, including inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS) and even cutaneous disorders. The most common intestinal symptoms attributed to *Blastocystis* infection are diarrhea and abdominal pain, as well as nonspecific symptoms, such as nausea, vomiting, fatigue and flatulence [19,22,64,67]. The findings of the current

study support a potentially pathogenic role for this protist, since most symptoms reported by infected patients were significantly more common in cases than in controls, including nausea, aerophagia, urticaria, anal itching and dyspepsia; moreover, the likelihood of having a *Blastocystis* infection increased with abdominal pain, anorexia and halitosis. In contrast, a higher proportion of patients in the control group presented episodes of diarrhea and fever, with the latter being even significantly more common in controls than in cases. However, our National Health Service only analyzes samples from patients attending consultations because of the presence of symptoms. For this reason, no controls without disease manifestations were available. Therefore, no conclusions on the pathogenic potential of *Blastocystis* could be directly reached from the analysis of our data set.

Diagnosis based only by the microscopic examination of stool specimens, lacking information relating to subtypes, is also a limitation of this study. Remarkable genetic diversity has been revealed among *Blastocystis* sp. from humans and animals, and differences in clinical significance have been suggested for different subtypes, an aspect which was not investigated in this study; however, at present, there is no widely accepted distinction between the pathogenic and non-pathogenic subtypes [8,16].

5. Conclusions

In summary, the results of the present study demonstrate a high prevalence of *Blastocystis* sp. infections in individuals with gastrointestinal illness in this geographical area, with most infected patients testing negative for protozoa or helminths. The probability of being infected with *Blastocystis* sp. significantly increased for underweight individuals and those native from Central and South America, and especially from Africa. Relative eosinophilia and some gastrointestinal symptoms, especially abdominal pain, anorexia and halitosis, but not diarrhea or fever, were associated with *Blastocystis* sp. detection. Co-infections with pathogenic bacteria were also related with *Blastocystis* sp. presence. A higher proportion of *Blastocystis* sp.-infected patients had type 2 diabetes and received some immunosuppressive treatments, such as chemotherapy, monoclonal antibodies or antiretroviral drugs, which could support the role of *Blastocystis* sp. as an opportunistic organism. This is the first case-control study of *Blastocystis* sp. in humans in northern Spain. Further research using molecular-based methods is needed to investigate the level of molecular diversity of *Blastocystis* sp. in this geographic area, and to ascertain the link between subtypes and factors associated with a higher risk of infection.

Author Contributions: Conceptualization, C.M., M.T.T., L.V.M., A.B. and J.Q.; methodology, C.M., M.T.T., L.V.M. and A.B.; software, M.T.T.; validation, C.M. and A.B.; formal analysis M.T.T. and L.V.M.; investigation, C.M., L.V.M., A.B. and J.Q.; resources, L.V.M. and J.Q.; data curation, M.T.T.; writing—original draft preparation, C.M., M.T.T., L.V.M., A.B. and J.Q.; writing—review and editing, C.M., M.T.T., L.V.M., A.B. and J.Q.; visualization, C.M., L.V.M. and J.Q.; supervision, L.V.M. and J.Q.; project administration, L.V.M. and J.Q.; funding acquisition, L.V.M. and J.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding for Article Processing Charges was provided by the Government of Aragón (Spain) via the Research Group A16_20R Zoonoses and Emerging Diseases of Public Health Significance.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Aragón (ref 18/081).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Availability of data will depend on specific permission from the Ethics Committee of Aragón.

Acknowledgments: The authors thank D. Savva for his help with English editing and Teresa Monteagudo for the technical assistance with the graphical abstract and Figure 1. The authors obtained permission to acknowledge both people mentioned in this section.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Roberts, T.; Barratt, J.; Harkness, J.; Ellis, J.; Stark, D. Comparison of Microscopy, Culture, and Conventional Polymerase Chain Reaction for Detection of *Blastocystis* sp. in Clinical Stool Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 308. [CrossRef] [PubMed]
2. Badparva, E.; Sadraee, J.; Kheirandish, F.; Frouzandeh, M. Genetic Diversity of Human Blastocystis Isolates in Khorramabad, Central Iran. *Iran. J. Parasitol.* **2014**, *9*, 44. [PubMed]
3. Tan, K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 639–665. [CrossRef]
4. El Safadi, D.; Gaayeb, L.; Meloni, D.; Cian, A.; Poirier, P.; Wawrzyniak, I.; Delbac, F.; Dabboussi, F.; Delhaes, L.; Seck, M.; et al. Children of Senegal River Basin Show the Highest Prevalence of *Blastocystis* sp. Ever Observed Worldwide. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 164. [CrossRef] [PubMed]
5. Torgerson, P.R.; Devleeschauwer, B.; Praet, N.; Speybroeck, N.; Willingham, A.L.; Kasuga, F.; Rokni, M.B.; Zhou, X.N.; Fèvre, E.M.; Sripa, B.; et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* **2015**, *12*, e1001920. [CrossRef] [PubMed]
6. Tan, K.S.W. Blastocystis in Humans and Animals: New Insights Using Modern Methodologies. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 121–144. [CrossRef]
7. Alfellani, M.A.; Jacob, A.S.; Perea, N.O.; Kreck, R.C.; Taner-Mulla, D.; Verweij, J.J.; Levecke, B.; Tannich, E.; Clark, C.G.; Stensvold, C.R. Diversity and Distribution of *Blastocystis* sp. Subtypes in Non-Human Primates. *Parasitology* **2013**, *140*, 966–971. [CrossRef]
8. Stensvold, C.R.; Clark, C.G. Current Status of Blastocystis: A Personal View. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 763–771. [CrossRef]
9. Oliveira-Arbex, A.P.; David, É.B.; Guimarães, S. Infection, Genetics and Evolution Blastocystis Genetic Diversity among Children of Low-Income Daycare Center in Southeastern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *57*, 59–63. [CrossRef]
10. Kim, M.J.; Won, E.J.; Kim, S.H.; Shin, J.H.; Chai, J.Y. Molecular Detection and Subtyping of Human Blastocystis and the Clinical Implications: Comparisons between Diarrheal and Non-Diarrheal Groups in Korean Populations. *Korean J. Parasitol.* **2020**, *58*, 321–326. [CrossRef]
11. Shirvani, G.; Fasihi-Harandi, M.; Raiesi, O.; Bazargan, N.; Zahedi, M.J.; Sharifi, I.; Kalantari-Khandani, B.; Nooshadokht, M.; Shabandoust, H.; Mohammadi, M.A.; et al. Prevalence and Molecular Subtyping of Blastocystis from Patients with Irritable Bowel Syndrome, Inflammatory Bowel Disease and Chronic Urticaria in Iran. *Acta Parasitol.* **2020**, *65*, 90–96. [CrossRef] [PubMed]
12. Scanlan, P.D.; Stensvold, C.R.; Rajilić-Stojanović, M.; Heilig, H.G.H.J.; De Vos, W.M.; O'Toole, P.W.; Cotter, P.D. The Microbial Eukaryote Blastocystis Is a Prevalent and Diverse Member of the Healthy Human Gut Microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *90*, 326–330. [CrossRef]
13. Stensvold, C.R.; van der Giezen, M. Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 369–377. [CrossRef]
14. Maloney, J.G.; Jang, Y.; Molokin, A.; George, N.S.; Santin, M. Wide Genetic Diversity of Blastocystis in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) from Maryland, USA. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1043. [CrossRef] [PubMed]
15. Wawrzyniak, I.; Poirier, P.; Viscogliosi, E.; Dionigia, M.; Texier, C.; Delbac, F.; Alaoui, H.E. Blastocystis, an Unrecognized Parasite: An Overview of Pathogenesis and Diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2013**, *1*, 167–178. [CrossRef] [PubMed]
16. Roberts, T.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. Update on the Pathogenic Potential and Treatment Options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* **2014**, *6*, 17. [CrossRef]
17. Kosik-Bogacka, D.; Lepczyńska, M.; Kot, K.; Szup, M.; Lanocha-Arendarczyk, N.; Dzika, E.; Grochans, E. Prevalence, Subtypes and Risk Factors of *Blastocystis* spp. Infection among Pre- and Perimenopausal Women. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1125. [CrossRef]
18. Cheng, H.; Haung, Z.; Lan, W.; Kuo, T.; Shin, J. Epidemiology of Blastocystis Hominis and Other Intestinal Parasites in a Vietnamese Female Immigrant Population in Southern Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2006**, *22*, 166–170. [CrossRef]
19. Stensvold, C.R.; Nielsen, H.V.; Mølbak, K.; Smith, H.V. Pursuing the Clinical Significance of Blastocystis—Diagnostic Limitations. *Trends Parasitol.* **2009**, *25*, 23–29. [CrossRef]
20. Nithyamathi, K.; Chandramathi, S.; Kumar, S. Predominance of *Blastocystis* sp. Infection among School Children in Peninsular Malaysia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0136709. [CrossRef]
21. Deng, Y.; Zhang, S.; Ning, C.; Zhou, Y.; Teng, X.; Wu, X.; Chu, Y.; Yu, Y.; Chen, J.; Tian, L.; et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors of *Blastocystis* sp. Infections among General Populations in Yunnan Province, Southwestern China. *Risk Manag. Healthc. Policy* **2020**, *13*, 1791–1801. [CrossRef] [PubMed]
22. El Safadi, D.; Cian, A.; Nourrisson, C.; Pereira, B.; Morelle, C.; Bastien, P.; Bellanger, A.; Botterel, F.; Candolfi, E.; Desoubreux, G.; et al. Prevalence, Risk Factors for Infection and Subtype Distribution of the Intestinal Parasite *Blastocystis* sp. from a Large-Scale Multi-Center Study in France. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 451. [CrossRef] [PubMed]
23. Hidalgo, L.; Salvador, F.; Sulleiro, E.; López, I.; Balladares, M.; García, E.; Paz, C.; Sánchez-Montalvá, A.; Bosch-Nicolau, P.; Sao-Avilés, A.; et al. Evaluation of Risk Factors Associated to Detection of *Blastocystis* sp. in Fecal Samples in Population from Barcelona, Spain: A Case-Control Study. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2019**, *38*, 1241–1247. [CrossRef] [PubMed]
24. Martín-Sánchez, A.M.; Canut-Blasco, A.; Rodríguez-Hernández, J.; Montes-Martínez, I.; García-Rodríguez, J.A. Epidemiology and Clinical Significance of Blastocystis Hominis in Different Population Groups in Salamanca (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* **1992**, *8*, 553–559. [CrossRef]
25. Aguila, C.; Navajas, R.; Gurbindo, D.; Ramos, J.; Mellado, M.; Fenoy, S.; Muñoz Fernandez, M.; Subirats, M.; Ruiz, J.; Pieniazek, N. Microsporidiosis in HIV-Positive Children in Madrid (Spain). *J. Eukaryot. Microbiol.* **1997**, *44*, 84–85. [CrossRef]

26. Reh, L.; Muadica, A.S.; Köster, P.C.; Balasegaram, S.; Verlander, N.Q.; Chércoles, E.R.; Carmena, D. Substantial Prevalence of Enteroparasites *cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in Asymptomatic Schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1900241. [[CrossRef](#)]
27. Salvador, F.; Lobo, B.; Goterris, L.; Alonso-Cotoner, C.; Santos, J.; Sulleiro, E.; Bailo, B.; Carmena, D.; Sánchez-Montalvá, A.; Bosch-Nicolau, P.; et al. *Blastocystis* sp. Carriage and Irritable Bowel Syndrome: Is the Association Already Established? *Biology* **2021**, *10*, 340. [[CrossRef](#)]
28. González-Moreno, O.; Domingo, L.; Teixidor, J.; Gracenea, M. Prevalence and Associated Factors of Intestinal Parasitisation: A Cross-Sectional Study among Outpatients with Gastrointestinal Symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 87–93. [[CrossRef](#)]
29. Muadica, A.S.; Köster, P.C.; Dashti, A.; Bailo, B.; Hernández-de-Mingo, M.; Reh, L.; Balasegaram, S.; Verlander, N.Q.; Chércoles, E.R.; Carmena, D. Molecular Diversity of *Giardia Duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in Asymptomatic School Children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms* **2020**, *8*, 446. [[CrossRef](#)]
30. Dacal, E.; Saugar, J.M.; De Lucio, A.; Hernández-De-Mingo, M.; Robinson, E.; Köster, P.C.; Aznar-Ruiz-De-Alegria, M.L.; Espasa, M.; Ninda, A.; Gandasegui, J.; et al. Prevalence and Molecular Characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. Isolates in School Children in Cubal, Western Angola. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 67. [[CrossRef](#)]
31. Blu F, A.; León C., E.; Román G., J.C.; Chanqueo, C.L.; García, C.P. Evaluación Del Rendimiento Del Coprocultivo En Pacientes Hospitalizados. *Rev. Chil. Infectol.* **2005**, *22*, 58–62. [[CrossRef](#)]
32. Rychert, J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *J. Infect. Epidemiol* **2019**, *2*, 1–5. [[CrossRef](#)]
33. Kaiser, H.F. An Index of Factorial Simplicity. *Psychometrika* **1974**, *39*, 32–36. [[CrossRef](#)]
34. Kaiser, H.F. The Application of Electronic Computers to Factor Analysis. *Educ. Psychol. Meas.* **1960**, *20*, 141–151. [[CrossRef](#)]
35. Cattell, R.B. The Scree Test for the Number of Factors. *Multivar. Behav. Res.* **1966**, *1*, 245–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ketchen, D.J., Jr.; Shook, C.L. The Application of Cluster Analysis in Strategic Management Research: An Analysis and Critique. *Strateg. Manag. J.* **1996**, *17*, 441–458. [[CrossRef](#)]
37. Hocking, R.R. A Biometrics Invited Paper. The Analysis and Selection of Variables in Linear Regression. *Biometrics* **1976**, *32*, 1. [[CrossRef](#)]
38. Fletcher, R.; Fletcher, S. *Clinical Epidemiology the Essentials*, 4th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2005.
39. Hilbe, J.M. *Logistic Regression Models*, 1st ed.; Chapman and Hall/CRC: New York, NY, USA, 2005.
40. Muhsen, K.; Levine, M.M. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between *Giardia Lambli*a and Endemic Pediatric Diarrhea in Developing Countries. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, S271–S293. [[CrossRef](#)]
41. Checkley, W.; White, A.J.; Jagannath, D.; Arrowood, M.; Chalmers, R.; Chen, X.; Fayer, R.; Griffiths, J.; Guerrant, R.; Hedstrom, L.; et al. A Review of the Global Burden, Novel Diagnostics, Therapeutics, and Vaccine Targets for *Cryptosporidium*. *Lancet. Infect. Dis.* **2015**, *15*, 85–94. [[CrossRef](#)]
42. Andersen, L.O.B.; Stensvold, C.R. *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 524–528. [[CrossRef](#)]
43. Paulos, S.; Köster, P.C.; de Lucio, A.; Hernández-de-Mingo, M.; Cardona, G.A.; Fernández-Crespo, J.C.; Stensvold, C.R.; Carmena, D. Occurrence and Subtype Distribution of *Blastocystis* sp. in Humans, Dogs and Cats Sharing Household in Northern Spain and Assessment of Zoonotic Transmission Risk. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, 993–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Windsor, J.J.; Macfarlane, L.; Hughes-Thapa, G.; Jones, S.K.A.; Whiteside, T.M. Incidence of *Blastocystis Hominis* in Faecal Samples Submitted for Routine Microbiological Analysis. *Br. J. Biomed. Sci.* **2002**, *59*, 154–157. [[CrossRef](#)]
45. Stensvold, C.; Arendrup, M.C.; Jespersgaard, C.; Mølbak, K.; Nielsen, H. Detecting *Blastocystis* Using Parasitologic and DNA-Based Methods: A Comparative Study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2007**, *59*, 303–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Masucci, L.; Graffeo, R.; Bani, S.; Bugli, F.; Boccia, S.; Nicolotti, N.; Fiori, B.; Fadda, G.; Spanu, T. Intestinal Parasites Isolated in a Large Teaching Hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, 19891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bart, A.; Wentink-Bonnema, E.M.S.; Gilis, H.; Verhaar, N.; Wassenaar, C.J.A.; van Vugt, M.; Goorhuis, A.; van Gool, T. Diagnosis and Subtype Analysis of *Blastocystis* sp. in 442 Patients in a Hospital Setting in the Netherlands. *BMC. Infect. Dis.* **2013**, *13*, 389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Van Gool, T.; Weijts, R.; Lammerse, E.; Mank, T.G. Triple Faeces Test: An Effective Tool for Detection of Intestinal Parasites in Routine Clinical Practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *22*, 284–290. [[CrossRef](#)]
49. Not, A.; Salvador, F.; Goterris, L.; Sulleiro, E.; López, I.; Balladares, M.; García, E.; Paz, C.; Sánchez-Montalvá, A.; Bosch-Nicolau, P.; et al. Microscopic Examination after Concentration Techniques for *Blastocystis* sp. Detection in Serial Faecal Samples: How Many Samples Are Needed? *Parasite Epidemiol. Control* **2020**, *9*, e00137. [[CrossRef](#)]
50. Rayan, P.; Verghese, S.; McDonnell, P.A. Geographical Location and Age Affects the Incidence of Parasitic Infestations in School Children. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **2010**, *53*, 498. [[CrossRef](#)]
51. El Fatni, C.; Olmo, F.; El Fatni, H.; Romero, D.; Rosales, M.J. First Genotyping of *Giardia Duodenalis* and Prevalence of Enteroparasites in Children from Tetouan (Morocco). *Parasite* **2014**, *21*, 48. [[CrossRef](#)]
52. Abu-Madi, M.; Aly, M.; Behnke, J.M.; Clark, C.G.; Balkhy, H. The Distribution of *Blastocystis* Subtypes in Isolates from Qatar. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 465. [[CrossRef](#)]

53. Osman, M.; El Safadi, D.; Cian, A.; Benamrouz, S.; Nourrisson, C.; Poirier, P.; Pereira, B.; Razakandrainibe, R.; Pinon, A.; Lambert, C.; et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with Cryptosporidium, Giardia, Blastocystis and Dientamoeba among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004496. [[CrossRef](#)]
54. Khaled, S.; Gantois, N.; Ly, A.T.; Senghor, S.; Even, G.; Dautel, E.; Dejager, R.; Sawant, M.; Baydoun, M.; Benamrouz-Vanneste, S.; et al. Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese School Children. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Guilavogui, T.; Gantois, N.; Even, G.; Desramaut, J.; Dautel, E.; Denoyelle, C.; Ibrahima, F.; Cherif, S.; Kourouma, B.L.; Sawant, M.; et al. Detection, Molecular Identification and Transmission of the Intestinal Protozoa *Blastocystis* sp. in Guinea from a Large-Scale Epidemiological Study Conducted in the Conakry Area. *Microorganisms* **2022**, *10*, 446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Stensvold, C.R.; Christiansen, D.B.; Olsen, K.E.P.; Nielsen, H.V. *Blastocystis* sp. Subtype 4 Is Common in Danish Blastocystis-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lhotská, Z.; Jirků, M.; Hložková, O.; Brožová, K.; Jirsová, D.; Stensvold, C.R.; Kolísko, M.; Jirků Pomajbíková, K. A Study on the Prevalence and Subtype Diversity of the Intestinal Protist *Blastocystis* sp. in a Gut-Healthy Human Population in the Czech Republic. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 544335. [[CrossRef](#)]
58. Abu-Madi, M.; Boughattas, S.; Behnke, J.M.; Sharma, A.; Ismail, A. Coproscopy and Molecular Screening for Detection of Intestinal Protozoa. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 414. [[CrossRef](#)]
59. Seyer, A.; Karasartova, D.; Ruh, E.; Güreser, A.S.; Turgal, E.; Imir, T.; Taylan-Ozkan, A. Epidemiology and Prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *96*, 1164. [[CrossRef](#)]
60. Messaad, S.A.; Laboudi, M.; Moumni, M.; Sarhane, B.; Belghyti, D.; El-Kharrim, K. Children Intestinal Parasites Related to Socio-Economic Factors in Salé Hospital, Morocco. *Int. J. Innov. Appl. Res.* **2014**, *8*, 833–840.
61. Abdulsalam, A.M.; Ithoi, I.; Al-Mekhlafi, H.M.; Khan, A.H.; Ahmed, A.; Surin, J.; Mak, J.W. Prevalence, Predictors and Clinical Significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasites Vectors* **2013**, *6*, 86. [[CrossRef](#)]
62. AbuOdeh, R.; Ezzedine, S.; Samie, A.; Stensvold, C.; ElBakri, A. Prevalence and Subtype Distribution of Blastocystis in Healthy Individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *37*, 158–162. [[CrossRef](#)]
63. Li, L.H.; Zhang, X.P.; Lv, S.; Zhang, L.; Yoshikawa, H.; Wu, Z.; Steinmann, P.; Utzinger, J.; Tong, X.M.; Chen, S.H.; et al. Cross-Sectional Surveys and Subtype Classification of Human Blastocystis Isolates from Four Epidemiological Settings in China. *Parasitol. Res.* **2007**, *102*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Beghini, F.; Pasoli, E.; Truong, T.D.; Putignani, L.; Cacciò, S.M.; Segata, N. Large-Scale Comparative Metagenomics of Blastocystis, a Common Member of the Human Gut Microbiome. *ISME J.* **2017**, *11*, 2848–2863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mirjalali, H.; Latifi, A.; Taghipour, A.; Yadegar, A.; Hatami, B.; Sadeghi, A.; Ehsani, M.J.; Zali, M.R. Association between Blastocystis and Body Mass Index in Healthy Subjects; a Theoretical Pilot Study. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2020**, *19*, 129–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Klastersky, J.; Aoun, M. Opportunistic Infections in Patients with Cancer. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 329–335. [[CrossRef](#)]
67. Khorshidvand, Z.; Khazaei, S.; Amiri, M.R.; Taherkhani, H.; Mirzaei, A. Worldwide Prevalence of Emerging Parasite Blastocystis in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb. Pathog.* **2021**, *152*, 104615. [[CrossRef](#)]
68. Mohamed, A.M.; Ahmed, M.A.; Ahmed, S.A.; Al-Semany, S.A.; Alghamdi, S.S.; Zagloul, D.A. Predominance and Association Risk of Blastocystis Hominis Subtype I in Colorectal Cancer: A Case Control Study. *Infect. Agents Cancer* **2017**, *12*, 21. [[CrossRef](#)]
69. Azimirad, M.; Gol, S.M.A.; Javanmard, E.; Mirjalali, H.; Yadegar, A.; Aghdaei, H.A.; Shahrokh, S.; Balahi, H.; Sadeghi, A.; Zali, M.R. Blastocystis and Clostridioides Difficile: Evidence for a Synergistic Role in Colonization among IBD Patients with Emphasis on Ulcerative Colitis. *Turk. J. Gastroenterol.* **2021**, *32*, 500. [[CrossRef](#)]
70. Popruk, N.; Prasongwattana, S.; Mahittikorn, A.; Palasuwan, A.; Popruk, S.; Palasuwan, D. Prevalence and Subtype Distribution of Blastocystis Infection in Patients with Diabetes Mellitus in Thailand. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 8877. [[CrossRef](#)]
71. Ibrahim, S.S.; Ismail, M.A.M.; Shaker, M.A.; Khalil, D.M.; Raafat, A. Blastocystis Hominis in Diabetic and Don-Diabetic Patients with Irritable Bowel Syndrome in Beni-Suef City, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **2020**, *50*, 683–688. [[CrossRef](#)]
72. Rostami, A.; Riahi, S.M.; Haghighi, A.; Saber, V.; Armon, B.; Seyyedtabaei, S.J. The Role of *Blastocystis* sp. and Dientamoeba Fragilis in Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 2361–2371. [[CrossRef](#)]
73. O'Connell, E.; Nutman, T. Eosinophilia in Infectious Diseases. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2015**, *35*, 493–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Sheehan, D.J.; Raucher, B.G.; McKittrick, J.C. Association of Blastocystis Hominis with Signs and Symptoms of Human Disease. *J. Clin. Microbiol.* **1986**, *24*, 548–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kodio, A.; Coulibaly, D.; Koné, A.K.; Konaté, S.; Doumbo, S.; Guindo, A.; Bittar, F.; Gouriet, F.; Raoult, D.; Thera, M.A.; et al. Blastocystis Colonization Is Associated with Increased Diversity and Altered Gut Bacterial Communities in Healthy Malian Children. *Microorganisms* **2019**, *7*, 649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Deng, L.; Wojciech, L.; Gascoigne, N.R.J.; Peng, G.; Tan, K.S.W. New Insights into the Interactions between Blastocystis, the Gut Microbiota, and Host Immunity. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009253. [[CrossRef](#)]

10. REFERENCIAS

- Abarca, N., Santín, M., Ortega, S., Maloney, J.G., George, N.S., Molokin, A., Cardona, G.A., Dashti, A., Köster, P.C., Bailo, B., Hernández-De-mingo, M., Muadica, A.S., Calero-Bernal, R., Carmena, D., González-Barrío, D., 2021. Molecular detection and characterization of *Blastocystis* sp. and enterocytozoon bienewisi in cattle in northern Spain. *Veterinary Sciences* 8, 191. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090191>
- Abda, B.I., Maatoug, N., Ben Romdhane, R., Bouhelmi, N., Zallegua, N., Aoun, K., Viscogliosi, E., Bouratbine, A., 2017. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96, 202–204. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0506>
- Abdel-Hameed, D.M., Hassanin, O.M., 2011. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitology Research* 109, 321–327. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2259-x>
- Abdel-Hameed, D.M., Hassanin, O.M., Zuel-Fakkar, N.M., 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitology Research* 108, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2097-2>
- Abdulsalam, A.M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H.M., Al-Mekhlafi, A.M., Ahmed, A., Surin, J., 2013a. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PLoS One* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084372>
- Abdulsalam, A.M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H.M., Khan, A.H., Ahmed, A., Surin, J., Mak, J.W., 2013b. Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasites and 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, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.003>
- Abu-Madi, M., Aly, M., Behnke, J.M., Clark, C.G., Balkhy, H., 2015. The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasites and Vectors* 8, 465. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1071-3>
- Abu-Madi, M., Boughattas, S., Behnke, J.M., Sharma, A., Ismail, A., 2017. Coproscopy and molecular screening for detection of intestinal protozoa. *Parasites and Vectors* 10, 414. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2346-7>
- Abu-Madi, M.A., Behnke, J.M., Ismail, A., 2008. Patterns of infection with intestinal parasites in Qatar among food handlers and housemaids from different geographical regions of origin. *Acta Tropica* 106, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.03.010>
- AbuOdeh, R., Ezzedine, S., Samie, A., Stensvold, C., ElBakri, A., 2016. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infection, Genetics and Evolution* 37, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.021>
- Adao, D.E. V., Dela Serna, A.O., Belleza, M.L.B., Bolo, N.R., Rivera, W.L., 2016. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from asymptomatic individuals in an urban community in the Philippines. *Annals of parasitology* 62, 192–200. <https://doi.org/10.17420/ap6203.53>
- Aguiar, J.I.A., Gonçalves, A.Q., Sodré, F.C., Pereira, S.D.R., Bóia, M.N., De Lemos, E.R.S., Daher, R.R., 2007. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: High prevalence of *Blastocystis hominis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40, 631–634. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000600006>
- Aguila, C., Navajas, R., Gurbindo, D., Ramos, J., Mellado, M., Fenoy, S., Muñoz Fernandez, M., Subirats, M., Ruiz, J., Pieniazek, N., 1997. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, 84–85. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05798.x>
- Ajjampur, S.S.R., Tan, K.S.W., 2016. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitology international* 65, 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>
- Alamlihi, L., Abufaied, M., Al-Allaf, A.W., 2020. An unusual cause of reactive arthritis with

- urticular: A case report. *Qatar Medical Journal* 2020, 1–4.
<https://doi.org/10.5339/qmj.2020.25>
- 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, 966–971.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013000255>
- 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., 2013b. Genetic Diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164, 497–509.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E.S.U., Fagbenro-Beyioku, A.F., Clark, C.G., 2013c. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica* 126, 11–18.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011>
- Alger, J., 2007. *Blastocystis hominis*: Pathogen or Commensal?. *Lancet* 337, 521–522.
- Alinaghizade, A., Mirjalali, H., Mohebbali, M., Stensvold, C.R., Rezaeian, M., 2017. Inter- and intra-subtype variation of *Blastocystis* subtypes isolated from diarrheic and non-diarrheic patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution* 50, 77–82.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.016>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Amin, O.M., 2002. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 799–803.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.799>
- Amorín, M.J., 2007. Mapa Sanitario de la Comunidad de Aragón 2007. Zaragoza.
- Andersen, L.O.B., Bonde, I., Nielsen, H.B.H.B., Stensvold, C.R., 2015. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS microbiology ecology* 91, 1–9.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiv072>
- Andersen, L.O.B., 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, 524–528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02520-15>
- Andersen, L.O.B., Vedel Nielsen, H., Stensvold, C.R., 2013. Waiting for the human intestinal Eukaryotome. *The ISME journal* 7, 1253–1255. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.21>
- Andiran, N., Acikgoz, Z.C., Turkay, S., Andiran, F., 2006. *Blastocystis hominis*-an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *Journal of Pediatric Surgery* 41, 1489–1491. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2006.04.037>
- 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 and Vectors* 6, 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-40>
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* 126, 1–9.
<https://doi.org/10.1017/S0031182002002640>
- Asghari, A., Sadeghipour, Z., Hassanipour, S., Abbasali, Z., Ebrahimzadeh-Parikhani, H., Hashemzaei, M., Alimardani, V., Hatam, G., 2021. Association between *Blastocystis* sp. infection and immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 60308–60328.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-16187-1>

- Asghari, A., Zare, M., Hatam, G., Shahabi, S., Gholizadeh, F., Motazedian, M., 2020. Molecular identification and subtypes distribution of *Blastocystis* sp. isolated from children and adolescent with cancer in Iran: evaluation of possible risk factors and clinical features. *Acta Parasitologica* 65, 462–473. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00186-2>
- Azimirad, M., Gol, S.M.A., Javanmard, E., Mirjalali, H., Yadegar, A., Aghdaei, H.A., Shahrokh, S., Balaii, H., Sadeghi, A., Zali, M.R., 2021. *Blastocystis* and *Clostridioides difficile*: evidence for a synergistic role in colonization among IBD patients with emphasis on ulcerative colitis. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 32, 500. <https://doi.org/10.5152/tjg.2021.19644>
- Badparva, E., Sadraee, J., Kheirandish, F., Frouzandeh, M., 2014. Genetic diversity of human *Blastocystis* isolates in Khorramabad, central Iran. *Iranian Journal of parasitology*, 9, 44.
- 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, 1693. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091693>
- Bahrami, F., Haghghi, A., Zamini, G., Khademerfan, M., 2020. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Blastocystis* subtypes in Kurdistan province, West of Iran. *Annals of parasitology*. <https://doi.org/10.17420/ap6601.234>
- Baldo, E.T., Belizario, V.Y., De Leon, W.U., Kong, H.H., Chung, D. Il, 2004. Infection status of intestinal parasites in children living in residential institutions in Metro Manila, the Philippines. *The Korean journal of parasitology* 42, 67–70. <https://doi.org/10.3347/kjp.2004.42.2.67>
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Research* 45, 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>
- Banaticla, J.E.G., Rivera, W.L., 2011. Detection and subtype identification of *Blastocystis* isolates from wastewater samples in the Philippines. *Journal of Water and Health* 9, 128–137. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.127>
- Barati, M., KarimiPourSaryazdi, A., Rahmanian, V., Bahadory, S., Abdoli, A., Rezanezhad, H., Solhjoo, K., Taghipour, A., 2022. Global prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in rodents, birds, and water supplies: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 208, 105770. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105770>
- Barbosa, C.V., Barreto, M.M., de Jesus Andrade, R., Sodr e, F., D’Avila-Levy, C.M., Peralta, J.M., Igreja, R.P., de Macedo, H.W., Santos, H.L.C., 2018. Intestinal parasite infections in a rural community of Rio de Janeiro (Brazil): Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes. *PLoS One* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193860>
- Barret, H.P., 1921. A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 15, 113–116. <https://doi.org/10.1080/00034983.1921.11684258>
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M.S., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C.J.A., 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>
- Bartlett, J., Stirling, D., 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226, 3-6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Beghini, F., Pasolli, E., Truong, T.D., Putignani, L., Cacci o, S.M., Segata, N., 2017. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *The ISME journal* 11, 2848–2863. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.139>
- Belleza, M.L., Cadacio, J.L., Borja, M.P., Solon, J.A., Padilla, M.A., Tongol-Rivera, P.N., Rivera, W.L., 2015. Epidemiologic study of *Blastocystis* infection in an urban community in the Philippines. *Journal of Environmental and Public Health*. <https://doi.org/10.1155/2015/894297>
- Berkman, D.S., Lescano, A.G., Gilman, R.H., Lopez, S.L., Black, M.M., 2002. Effects of stunting,

- diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. *Lancet* 359, 564–571. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07744-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07744-9)
- Beyhan, Y.E., Yilmaz, H., Cengiz, Z.T., Ekici, A., 2015. Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. *Saudi Medical Journal* 36, 1118–1121. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.9.12444>
- Blu F., A., León C., E., Román G., J.C., Chanqueo C., L., García C., P., 2005. Evaluación del rendimiento del coprocultivo en pacientes hospitalizados. *Revista chilena de infectología* 22, 58–62. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182005000100008>
- Boccardo, G., De Prisco, O., Ettari, G., Donato, G., Maurino, D., Savoia, D., 1996. Protozoan infection (*Blastocystis hominis*) concomitant with *Pseudomonas* sp. peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology* 48, 55–58.
- Böhm-Gloning, B., Knobloch, J., Walderich, B., 1997. Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical Medicine and International Health* 2, 771–778.
- Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, L.Z., Leelayoova, S., Jones, M.S., 2008. Oh my aching gut: Irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites and Vectors* 1, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-40>
- Boreham, P., Stenzel, D., 1993a. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology, and epizootiology, *Advances in Parasitology*.
- Boreham, P., Stenzel, D., 1993b. The Current Status of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Today* 9, 251.
- Boreham, R., Benson, S., Stenzel, D., Boreham, P., 1996. *Blastocystis hominis* infection. *The Lancet* 348, 272–273.
- Branders, V., Mardulyn, P., 2016. Improving intraspecific allele networks inferred by maximum parsimony. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 90–95. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12455>
- Burki, F., Okamoto, N., Pombert, J.F., Keeling, P.J., 2012. The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: Phylogenomic evidence for separate origins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 2246–2254. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2301>
- 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, 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 67, 273–278. <https://doi.org/10.1111/jeu.12772>
- Calik, S., Karaman, U., Colak, C., 2011. Prevalence of *Microsporidium* and Other Intestinal Parasites in Children from Malatya, Turkey. *Indian Journal of Microbiology* 51, 345–349. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0107-4>
- Can, H., Köseoğlu, A.E., Alak, S.E., Güvendi, M., Ün, C., Karakavuk, M., Döşkaya, A.D., Aykur, M., Gökmen, A.A., Gürüz, A.Y., Döşkaya, M., 2021. Molecular prevalence and subtyping of *Blastocystis* sp. isolates in stray cats of Izmir, Turkey: First report of “ ST4 allele 42 ” in cats. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 24, 217–223. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.137656>
- Cañavate, A.C., Cuadros, J., Martín-rabadán, P., 2009. *Microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas*.
- Candela, E., Goizueta, C., Periago, M.V., Antoli, C.M., 2021. Prevalence of intestinal parasites

- and molecular characterization of *Giardia intestinalis*, *Blastocystis* spp. and *Entamoeba histolytica* in the village of Fortín Mbororé (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina). *Parasites and Vectors* 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04968-z>
- Carbajal, J., Villar, J., Lanuza, M., Esteban, J., Muñoz, C., Borrás, R., 1997. Significación clínica de la infección por *Blastocystis hominis*: estudio epidemiológico. *Medicina Clínica* 108, 608–612.
- Carranza-Rodriguez, C., Pardo-Lledias, J., Muro-Alvarez, A., Pérez-Arellano, J.L., 2008. Cryptic parasite infection in recent west African immigrants with relative eosinophilia. *Clinical Infectious Diseases* 46, 48–50. <https://doi.org/10.1086/528865>
- 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>
- Cattell, R.B., 1966. The scree test for the number of factors. *Multivariate behavioral research* 1, 245–276. https://doi.org/10.1207/s15327906mbr0102_10
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73, 203–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x>
- 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, 1459–1463. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1825-y>
- Checkley, W., White, A.J., Jaganath, D., Arrowood, M., Chalmers, R., Chen, X., Fayer, R., Griffiths, J., Guerrant, R., Hedstrom, L., Huston, C., Kotloff, K., Kang, G., Mead, J., Miller, M., Petri, W.J., Priest, J., Roos, D., Striepe, B., Thompson, R., Ward, H., Van Voorhis, W., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases* 15, 85–94. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70772-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70772-8)
- Cheng, H.S., Guo, Y.L., Shin, J.W., 2003. Hematological effects of *Blastocystis hominis* infection in male foreign workers in Taiwan. *Parasitology research* 90, 48–51. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0804-3>
- Chihi, A., O'Brien Andersen, L., Aoun, K., Bouratbine, A., Stensvold, C.R., 2022. Amplicon-based next-generation sequencing of eukaryotic nuclear ribosomal genes (metabarcoding) for the detection of single-celled parasites in human faecal samples. *Parasite Epidemiology and Control* 17, e00242. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00242>
- Cirioni, O., Giacometti, A., Drenaggi, D., Ancarani, F., Scalise, G., 1999. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *European Journal of Epidemiology* 15, 389–393. <https://doi.org/10.1023/A:1007551218671>
- Clark, C.G., 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 87, 79–83. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00046-7)
- Clark, C.G., Van der Giezen, M., Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., 2013. Recent developments in *Blastocystis* research., *Advances in Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0>
- Cohen, A., Colford, J.M., 2017. Effects of boiling drinking water on diarrhea and pathogen-specific infections in low- and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 1362–1377. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0190>
- Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D.O., Craun, G.F., Fayer, R., Gannon, V.P.J., 2004. *Waterborne Zoonoses: Identification Causes and Control*. World Health Organization, International Water Association Publications.
- Coyle, C.M., Varughese, J., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., 2012. *Blastocystis*: To treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases* 54, 105–110. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>
- Cristanziano, V. Di, 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, 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221968>
- 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 and Vectors* 11, 67. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2640-z>
- Dagci, H., Kurt, Ö., Demirel, M., Mandiracioglu, A., Aydemir, S., Saz, U., Bart, A., VAN Gool, T., 2014. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in Izmir province, Turkey. *Iranian journal of parasitology* 9, 519–29.
- Daryani, A., Sharif, M., Nasrolahei, M., Khalilian, A., Mohammadi, A., Barzegar, G., 2012. Epidemiological survey of the prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in Sari, northern Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106, 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.010>
- Das, R., Khalil, S., Mirdha, B.R., Makharia, G.K., Dattagupta, S., Chaudhry, R., 2016. Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* species in irritable bowel syndrome patients from north India. *PLoS One* 11, 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147055>
- Del Coco, V.F., Molina, N.B., Basualdo, J.A., Córdoba, M.A., 2017. *Blastocystis* spp.: Advances, controversies and future challenges. *Revista Argentina de Microbiología* 49, 110–118.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.004>
- DeLong, E. dwar. F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5685–5689. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5685>
- 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, 1179–1189. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i3.21>
- Deng, L., Wojciech, L., Gascoigne, N.R.J., Peng, G., Tan, K.S.W., 2021. New insights into the interactions between *Blastocystis*, the gut microbiota, and host immunity. *PLoS Pathogens* 17, e1009253. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009253>
- Deng, Y., Zhang, S., Ning, C., Zhou, Y., Teng, X., Wu, X., Chu, Y., Yu, Y., Chen, J., Tian, L., Wang, W., 2020. Molecular epidemiology and risk factors of *Blastocystis* sp. Infections among general populations in Yunnan Province, Southwestern China. *Risk Management and Healthcare Policy* 13, 1791–1801. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S269664>
- Diaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., Bernal, R., 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 384–385. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.384>
- Dib, J.R., Fernández-Zenoff, M. V., Oquilla, J., Lazarte, S., González, S.N., 2015. Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina. *Tropical Biomedicine* 32, 210–215.
- Dogan, N., Aydin, M., Tuzemen, N.U., Dinleyici, E.C., Oguz, I., Dogruman-Al, F., 2017. Subtype distribution of *Blastocystis* spp. isolated from children in Eskisehir, Turkey. *Parasitology International* 66, 948–951. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.008>
- Dogruman-Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, Ö., Demirel, M., 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*.
<https://doi.org/10.1007/s00436-008-1031-3>
- Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., Araz, E., Boorum, K., 2009a. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 724–727.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500011>
- 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, 495–500. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4208-y>
- Dogruman-Al, F., Yoshikawa, H., Kustimur, S., Balaban, N., 2009b. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology Research* 106, 263–268. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1658-8>
- 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, 949–955. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1485-y>
- Doyle, P.W., Helgason, M.M., Mathias, R.G., Proctor, E.M., 1990. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 116–121. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.1.116-121.1990>
- Dunn, L.A., Boreham, P.F.L., 1991. The in-vitro activity of drugs against *blastocystis hominis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27, 507–516. <https://doi.org/10.1093/jac/27.4.507>
- Dunn, L.A., Boreham, P.F.L., Stenzel, D.J., 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology* 19, 43–56. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90020-9)
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Efron, B., 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Annals Statistics* 7, 26.
- El Fatni, C., Olmo, F., El Fatni, H., Romero, D., Rosales, M.J., 2014. First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite* 21, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014049>
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A., 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, 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 Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L., Wawrzyniak, I., Delbac, F., El Alaoui, H., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Mallat, H., Dabboussi, F., Hamze, M., Viscogliosi, E., 2013. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88, 1203–1206. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0777>
- El Saftawy, E.A., Amin, N.M., Hamed, D.H., Elkazazz, A., Adel, S., 2019. The hidden impact of different *Blastocystis* genotypes on C-3 and IgE serum levels: a matter of debate in asthmatic Egyptian children. *Journal of Parasitic Diseases* 43, 443–451. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01108-4>
- Elghareeb, A., Fakahany, A. El, Nagaty, I., Nagib, M., Younis, M., 2015. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Tropical Parasitology* 5, 36. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.149919>
- Enright, M.C., Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* 482, 482–487. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_11
- Eroglu, F., Gene, A., Elgun, K., Koltas, I.S., 2009. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitology research* 105.

- <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1595-6>
- Eroglu, F., Koltas, I.S., 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitology research* 107, 841–845. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1937-4>
- Ertuğ, S., Dost, T., Ertabaklar, H., Gültekin, B., 2009. The effect of trimethoprim-sulfamethoxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Turkiye Parazitolojii Dergisi* 33, 270–2.
- Ertug, S., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Bozdogan, B., 2016. Multilocus sequence typing of *Blastocystis* isolates in Aydin, Turkey. *Parasitology International* 65, 760–762. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.06.006>
- Escobedo, A.A., Cañete, R., Núñez, F.A., 2007. Intestinal protozoan and helminth infections in the Municipality San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *Tropical Doctor* 37, 236–238. <https://doi.org/10.1258/004947507782332991>
- Even, G., Lokmer, A., Rodrigues, J., Audebert, C., Viscogliosi, E., Ségurel, L., Chabé, M., 2021. Changes in the Human Gut Microbiota Associated With Colonization by *Blastocystis* sp. and *Entamoeba* spp. in Non-Industrialized Populations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.533528>
- Fabián de Estrada, M.B., Tello Casanova, R., Náquira Velarde, C., 2003. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Lima.
- Farthing, M.J.G., 2006. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 3, 436–445. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0557>
- Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J., Santin, M., 2014. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research* 113, 1465–1472. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3787-y>
- Fayer, R., Santin, M., MacArisin, D., 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research* 111, 1349–1355. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2971-1>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Figueroa, M., Mora, L., Silva, H., 2017. Comparación de seis métodos coproscópicos para el diagnóstico del cromista *Blastocystis* spp. *Saber* 29, 66–75.
- Fleta Zaragoza, J., Clavel Parrilla, A., Castillo García, F., Bueno Lozano, M., Sarría Chueca, A., 1993. *Blastocystis hominis* y dolor abdominal en la infancia. *Anales Españoles de Pediatría* 38, 13–6.
- Fletcher, R., Fletcher, S., 2005. *Clinical Epidemiology The Essentials*, 4th ed. Baltimore.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2012. Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 25, 420–449. <https://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H., Evengård, B., 2016. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites and Vectors* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1637-8>
- Forsell, J., Granlund, M., Stensvold, C.R., Clark, G.C., Evengård, B., 2012. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31, 1689–1696. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1416-6>
- Fouad, S.A., Basyoni, M.M., Fahmy, R.A., Kobaisi, M.H., 2011. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology* 12, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2011.11.005>
- Frankham, R., Ballou, J., Briscoe, D., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 617.

- 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>
- Galán-Puchades, M.T., Trelis, M., Sáez-Durán, S., Cifre, S., Gosálvez, C., Sanxis-Furió, J., Pascual, J., Bueno-Marí, R., Franco, S., Peracho, V., Montalvo, T., Fuentes, M.V., 2021. One health approach to zoonotic parasites: Molecular detection of intestinal protozoans in an urban population of norway rats, *rattus norvegicus*, in Barcelona, Spain. *Pathogens* 10, 0–7. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030311>
- Gallegos, L., González, A., López-urbina, T., Gonzales-, E., 2013. Comparación de la eficacia de tres medios de cultivo in vitro para el desarrollo de *Blastocystis* spp. 24, 480–488.
- Garavelli, P.L., Scaglione, L., Biccocchi, R., Libanore, M., 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Infection* 19, 185.
- García-Martos, P., Benjumeda, M., 1992. *Blastocystis hominis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 10, 421–4.
- Ghimire, A., Bhandari, S., Tandukar, S., Amatya, J., Bhandari, D., Sherchand, J.B., 2016. Enteric parasitic infection among HIV-infected patients visiting Tribhuvan University Teaching Hospital, Nepal. *BMC Research Notes* 9, 5–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2007-5>
- Ghosh, K., Ayyaril, M., Nirmala, V., 1998. Acute GVHD involving the gastrointestinal tract and infestation with *Blastocystis hominis* in a patient with chronic myeloid leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 22, 1115–1117. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701488>
- Giacometti, A., Cirioni, O., Fiorentini, A., Fortuna, M., Scalise, G., 1999. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18, 436–439. <https://doi.org/10.1007/s100960050314>
- Gong, B., Liu, X., Wu, Y., Xu, N., Xu, M., Yang, F., Tong, L., Zhou, K., Cao, J., Liu, A., Shen, Y., 2019. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in ethnic minority groups on both sides of the China-Myanmar border, and assessment of risk factors. *Parasite* 26. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019046>
- 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, 87–93. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2044-2>
- Govind, S., Khairul, A., Smith, H., 2002. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends in parasitology* 18, 528.
- Guilavogui, T., Gantois, N., Even, G., Desramaut, J., Dautel, E., Denoyelle, C., Ibrahima, F., Cherif, S., Kourouma, B.L., Sawant, M., Chab, M., Certad, G., Viscogliosi, E., 2022. Detection, molecular identification and transmission of the intestinal protozoa *Blastocystis* sp. in Guinea from a large-scale epidemiological study conducted in the Conakry Area. *Microorganisms* 10, 446.
- Guimarães, S. S. I., 1993. *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 427–429.
- Gupta, R., Parsi, K., 2006. Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australasian Journal of Dermatology* 47, 117–119. <https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2006.00244.x>
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* 41, 95–98.
- Hashim, H.O., Al-Shuhaib, M.B.S., 2019. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 6, 137–144. <https://doi.org/10.29252/JABR.06.04.02>
- Henriksen, S., Pohlenz, J., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen

- technique. *Acta veterinaria scandinavica* 22, 594–6.
<https://doi.org/10.15537/smj.2019.12.24643>
- Hernández-Castro, C., Dashti, A., Vusirikala, A., Balasegaram, S., Köster, P.C., Bailo, B., Imaña, E., López, A., Llorente, M.T., González-Barrio, D., Sánchez, S., Carmena, D., 2023. 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, 213–223.
<https://doi.org/10.1007/s00431-022-04662-x>
- Heydari-Hengami, M., Hamed, Y., Najafi-Asl, M., Sharifi-Sarasiabi, K., 2018. Prevalence of intestinal parasites in food handlers of Bandar Abbas, southern Iran. *Iranian Journal of Public Health* 47, 111.
- Hidalgo, L., Salvador, F., Sulleiro, E., López, I., Balladares, M., García, E., Paz, C., Sánchez-Montalvá, A., Bosch-Nicolau, P., Sao-Avilés, A., Molina, I., 2019. Evaluation of risk factors associated to detection of *Blastocystis* sp. in fecal samples in population from Barcelona, Spain: a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 38, 1241–1247. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03532-z>
- 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, 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.732129>
- Hilbe, J.M., 2005. Logistic regression models, 1st ed. New York, NY, USA.
- Ho, L., Armiugam, A., Jeyaseelan, K., Yap, E., Singh, M., 2000. *Blastocystis* elongation factor-1 α : genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology* 121, 135–44. <https://doi.org/10.1017/s0031182099006113>
- Ho, L.C., Singh, M., Suresh, G., Ng, G.C., Yap, E.H., 1993. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology Research* 79, 614–616.
<https://doi.org/10.1007/BF00932249>
- Hocking, R.R., 1976. A biometrics invited paper. The analysis and selection of variables in linear regression. *Biometrics* 32, 1. <https://doi.org/10.2307/2529336>
- Hollebeke, N., Mayberry, L., 1994. Taxonomic Uncertainty and *Blastocystis* (Protista: Sarcodina). *Parasitology* 10, 64.
- Horiki, N., Kaneda, Y., Maruyama, M., Fujita, Y., Tachibana, H., 1999. Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 400–402. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.400>
- Horiki, N., Maruyama, M., Fujita, Y., Yonekura, T., Minato, S., Kaneda, Y., 1997. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56, 370–374. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.370>
- Hublin, J.S.Y., Maloney, J.G., Santin, M., 2021. *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.031>
- Hussein, E.M., Hussein, A.M., Eida, M.M., Atwa, M.M., 2008. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitology research* 102, 853–860. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0833-z>
- Ibrahim, H.S., Salem, A.I., Ahmed, N.M.A.E.R., El-Taweel, H.A., 2021. Pre-and post-treatment evaluation of intestinal inflammation in *Giardia* and *Blastocystis* infected children: a community-based study. *Journal of Parasitic Diseases* 45, 1026–1033.
<https://doi.org/10.1007/s12639-021-01398-7>
- Ibrahim, S.S., Ismail, M.A.M., Shaker, M.A., Khalill, D.M., Raafat, A., 2020. *Blastocystis hominis* in diabetic and non-diabetic patients with irritable bowel syndrome in Beni-Suef City, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 50, 683–688.
<https://doi.org/10.21608/jesp.2020.131115>

- Javanmard, E., Niyyati, M., Ghasemi, E., Mirjalali, H., Asadzadeh Aghdaei, 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>
- Jelinek, T., Peyerl, G., Löscher, T., Von Sonnenburg, F., Nothdurft, H.D., 1997. The role of Blastocystis hominis as a possible intestinal pathogen in travellers. *Journal of Infection* 35, 63–66. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(97\)91025-2](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(97)91025-2)
- Jiang, J.B., He, J.G., 1993. Taxonomic status of Blastocystis hominis. *Parasitology Today* 9, 2–3. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90148-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90148-9)
- Jiménez, P.A., Jaimes, J.E., Ramírez, J.D., 2019. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. *Parasites and Vectors* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>
- Jinatham, V., Maxamhud, S., Pipluechai, 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, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746340>
- Johnson, A.M., Thanou, A., Boreham, P.F.L., Baverstock, P.R., 1989. Blastocystis hominis: Phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* 68, 283–288. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90110-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90110-0)
- Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research* 3, 1–20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jones, M.S., 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, 551–557. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1006-4>
- Jones, M.S., Whipps, C.M., Ganac, R.D., Hudson, N.R., Broom, K., 2009. Association of Blastocystis subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research* 104, 341–345. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1198-7>
- Kaiser, H.F., 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and psychological measurement* 20, 141–151. <https://doi.org/10.1177/001316446002000116>
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.J., Fujita, Y., Maruyama, M., Tachibana, H., 2001. Ribodemes of Blastocystis Hominis isolated in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 393–396. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.393>
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.J., Tachibana, H., Tsutsumi, Y., 2000. Serologic response to Blastocystis hominis infection in asymptomatic individuals. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 25, 51–56.
- Karasartova, D., Gureser, A.S., Ruh, E., Turegun-Atasoy, B., Calgin, M.K., Tasci, L., Taylan-Ozkan, A., 2018. An alternative DNA extraction method for detection of Blastocystis spp. in human fecal samples. *Experimental Parasitology* 186, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.019>
- Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C.M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., Vakalis, N., 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of Blastocystis sp. subtype 3. *Acta Dermato-Venereologica* 88, 80–81. <https://doi.org/10.2340/00015555-0338>
- Katsumata, M., Yoshikawa, H., Tokoro, M., Mizuno, T., Nagamoto, T., Hendarto, J., Asih, P.B.S., Rozi, I.E., Kimata, I., Takami, K., Syafruddin, D., 2018. Molecular phylogeny of Blastocystis isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitology Research* 117, 2841–2846. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5973-9>
- Kaya, S., Cetin, E.S., Aridoğan, B.C., Arıkan, S., Demirci, M., 2007. Pathogenicity of Blastocystis hominis, a clinical reevaluation. *Turkish Society for Parasitology* 31, 184–187.
- Kellogg, J.A., Elder, C.J., 1999. Justification for use of a single trichrome stain as the sole means for routine detection of intestinal parasites in concentrated stool specimens. *Journal of*

- Clinical Microbiology 37, 835–837. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.3.835-837.1999>
- Kesuma, Y., Firmansyah, A., Bardosono, S., Sari, I.P., Kurniawan, A., 2019. Blastocystis ST-1 is associated with Irritable Bowel Syndrome-diarrhoea (IBS-D) in Indonesian adolescences. Parasite Epidemiology and Control 6, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00112>
- Ketchen, Jr, D.J. and, Shook, C.L., 1996. The application of cluster analysis in strategic management research: an analysis and critique. Strategic management journal 17, 441–458. <https://doi.org/10.2991/icesms-16.2017.104>
- Khaled, S., Gantois, N., Ayoubi, A., Even, G., Sawant, M., El Houmayraa, J., Nabot, M., Benamrouz-Vanneste, S., Chabé, M., Certad, G., El Safadi, D., Dabboussi, F., Hamze, M., Viscogliosi, E., 2021. Blastocystis sp. Prevalence and subtypes distribution amongst syrian refugee communities living in North Lebanon. Microorganisms 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010184>
- 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, 1408. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091408>
- Khorshidvand, Z., Khazaei, S., Amiri, M.R., 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>
- Kim, M.J., Lee, Y.J., Kim, T.J., Won, E.J., 2022. Gut microbiome profiles in colonizations with the enteric protozoa Blastocystis in korean populations. Microorganisms 10, 1–9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010034>
- Kim, M.J., Won, E.J., Kim, S.H., Shin, J.H., Chai, J.Y., 2020. Molecular detection and subtyping of human Blastocystis and the clinical implications: Comparisons between diarrheal and non-diarrheal groups in korean populations. The Korean Journal of Parasitology 58, 321–326. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.3.321>
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of molecular evolution 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9284-8>
- Klastersky, J., Aoun, M., 2004. Opportunistic infections in patients with cancer. Annals of oncology 15, 329–335. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh947>
- Kodio, A., Coulibaly, D., Koné, A.K., Konaté, S., Doumbo, S., Guindo, A., Bittar, F., Gouriet, F., Raoult, D., Thera, M.A., Ranque, S., 2019. Blastocystis colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. Microorganisms 7, 649. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120649>
- Köksal, F., Başlantı, I., Samasti, M., 2010. A retrospective evaluation of the prevalence of intestinal parasites in Istanbul, Turkey. Turkish Society for Parasitology 34, 166–171.
- Koltas, I.S., Eroglu, F., 2016. Subtype analysis of Blastocystis isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. Experimental Parasitology. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.006>
- 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, 1125. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06815-z>
- Köster, P.C., Pérez-Ayala, A., Molina, A., Trelis, M., Ruiz, G., García-Hortelano, M., Mellado, M.J., Azcona Gutiérrez, J.M., Martín, O.; Paulos, S., Carmena, D., 2019. Variabilidad genética de Blastocystis sp. en pacientes atendidos en hospitales públicos españoles, in: XI Congress of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health, Ávila, Spain, 27–30 October.
- Köster, P C, Dashti, A., Bailo, B., Muadica, A.S., Maloney, J.G., Santín, M., Chicharro, C., Miguel,

- S., Nieto, F.J., Cano-Terriza, D., Garc, I., Guerra, R., Ponce-Gordo, F., Calero-Bernal, R., Gonz, D., Carmena, D., 2021. 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* 11, 700.
- Köster, Pamela C, Renelies-hamilton, J., Dotras, L., Llana, M., Vinagre-izquierdo, C., Prakas, P., Sneideris, D., Dashti, A., Bailo, B., Lanza, M., Jim, A., Muñoz-Garcia, C., Muadica, A.S., Gonz, D., Rubio, J.M., Fuentes, I., Ponce-gordo, F., Calero-bernal, R., Carmena, D., 2021. Molecular Detection and Characterization of Intestinal and Blood Parasites in Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in Senegal. *Animals* 11, 3291. <https://doi.org/10.3390/ani11113291>.
- Kukoschke, K.G., Muller, H.E., 1991. SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic *Blastocystis hominis* strains. *Journal of Medical Microbiology* 35, 35–39. <https://doi.org/10.1099/00222615-35-1-35>
- Kurniawan, A., Karyadi, T., Dwintasari, S.W., Sari, I.P., Yuniastuti, E., Djauzi, S., Smith, H. V., 2009. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 892–898. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.017>
- Kurt, O., Al, F.D., Stensvold, C.R., Tsaousis, A.D., 2021. The 3rd International Blastocystis Conference: coming together virtually. *Trends in Parasitology* 37, 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.002>
- Leder, K., Hellard, M.E., Sinclair, M.I., Fairley, C.K., Wolfe, R., 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *Journal of gastroenterology and hepatology* 20, 1390–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03868.x>
- Lee, I.L., Tan, T.C., Tan, P.C., Nanthiney, D.R., Biraj, M.K., Surendra, K.M., Suresh, K.G., 2012. Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitology Research* 110, 1553–1562. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2665-0>
- Lee, M.G., Rawlins, S.C., Didier, M., DeCeulaer, K., 1990. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Annals of the Rheumatic Diseases* 49, 192–193. <https://doi.org/10.1136/ard.49.3.192>
- Lee, M.J., 1990. Pathogenicity of *Blastocystis hominis* 27, 2089.
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., Mungthin, M., 2008. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *American journal of tropical medicine and hygiene* 79, 401–406.
- Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M., 2002. In vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 96, 803–807.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- 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 and infectious diseases* 36, 1531–1540. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2965-0>
- Letunic, I., Bork, P., 2021. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lewin, B., 2004. *Genes VIII*. New Jersey, USA.
- 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, L.H., Zhang, X.P., Lv, S., Zhang, L., Yoshikawa, H., Wu, Z., Steinmann, P., Utzinger, J., Tong, X.M., Chen, S.H., Zhou, X.N., 2007a. Cross-sectional surveys and subtype classification of human Blastocystis isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitology research* 102, 83–90. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0727-0>
- Li, L.H., Zhou, X.N., Du, Z.W., Wang, X.Z., Wang, L.B., Jiang, J.Y., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.X., Chen, S.H., Zhang, L., 2007b. Molecular epidemiology of human Blastocystis in a village in Yunnan province, China. *Parasitology international* 56, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.06.001>
- Liu, X., Ni, F., Wang, R., Li, J., Ge, Y., Yang, X., Qi, M., Zhang, L., 2022. Occurrence and subtyping of Blastocystis in coypus (*Myocastor coypus*) in China. *Parasites and Vectors* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05126-1>
- Londoño, Á.L., Mejía, S., Gómez-Marín, J.E., 2009. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarcá, Colombia. *Revista de Salud Publica* 11, 72–81. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000100008>
- Lucía, J.F., Aguilar, C., Betran, A., 2007. Blastocystis hominis colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. *Haemophilia* 13, 224–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01434.x>
- Llorente, M.T., Clavel, A., Goñi, M.P., Varea, M., Seral, C., Becerril, R., Suarez, L., Gómez-Lus, R., 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International* 56, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.02.003>
- Machado, E.R., Matos, N.O., Rezende, S.M., Carlos, D., Silva, T.C., Rodrigues, L., Rodrigues, M.J., De Oliveira, M.R.F., Muniz-Junqueira, M.I., Gurgel-Gonçalves, R., 2018. Host-parasite interactions in individuals with type 1 and 2 diabetes result in higher frequency of *Ascaris lumbricoides* and *Giardia lamblia* in type 2 diabetic individuals. *Journal of Diabetes Research*. <https://doi.org/10.1155/2018/4238435>
- Mahadani, A.K., Awasthi, S., Sanyal, G., Bhattacharjee, P., Pippal, S., 2022. Indel-K2P: a modified Kimura 2 Parameters (K2P) model to incorporate insertion and deletion (Indel) information in phylogenetic analysis. *Cyber-Physical Systems* 8, 32–44. <https://doi.org/10.1080/23335777.2021.1879274>
- Mahdavi, F., Asghari, A., Shahabi, S., Shamsi, L., Soltani-Jazi, F., Sadrebazzaz, A., Shams, M., 2022. Distribution, genetic diversity, and zoonotic significance of Blastocystis subtypes in pet dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 88, 101848. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101848>
- Malatyali, E., Tileklioglu, E., Yildiz, I., Unsal, O., Demirag, S., Hatice, E., Ertug, S., 2021. Investigation of the relationship between obesity and Blastocystis infection in an adult population in Aydin, Turkey. *Annals of Parasitology* 67, 249–255. <https://doi.org/10.17420/ap6702.336>
- Malheiros, A.F., Stensvold, C.R., Clark, C.G., Braga, G.B., Shaw, J.J., 2011. Short report: Molecular characterization of Blastocystis obtained from members of the indigenous tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 1050–1053. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0481>
- 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, 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, 1043. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061343>
- Maloney, J.G., Lombard, J.E., Urie, N.J., Shivley, C.B., Santin, M., 2019a. Zoonotic and

- genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research* 118, 575–582. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3>
- 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., Santin, M., 2020b. Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites and Vectors* 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04484-6>
- Maloney, J.G., Molokin, A., Santin, M., 2020c. Assessment of next generation amplicon sequencing of the beta-giardin gene for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages and mixed infections. *Food and Waterborne Parasitology* 21, e00098. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00098>
- Maloney, J.G., Molokin, A., Santin, M., 2019b. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution* 73, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>
- Maloney, J.G., Molokin, A., Segu, R., Maravilla, P., Mart, F., Villalobos, G., Tsaousis, A.D., Gentekaki, E., Muñoz-antol, C., Klisiowicz, D.R., Oishi, C.Y., Toledo, R., Esteban, J.G., Köster, P.C., Lucio, A. De, Dashti, A., Bailo, B., Calero-bernal, R., Gonz, D., Carmena, D., 2023. Identification and Molecular Characterization of Four New *Blastocystis* Subtypes Designated ST35-ST38. *Microorganisms* 11, 46. <https://doi.org/doi.org/10.3390/microorganisms11010046>
- 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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050997>
- Mardani Katakai, M., Tavalla, M., Beirumvand, M., 2019. Higher prevalence of *Blastocystis hominis* in healthy individuals than patients with gastrointestinal symptoms from Ahvaz, southwestern Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 65, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.05.018>
- Martín-Sánchez, A.M., Canut-Blasco, A., Rodríguez-Hernandez, J., Montes-Martínez, I., García-Rodríguez, J.A., 1992. Epidemiology and clinical significance of *Blastocystis hominis* in different population groups in Salamanca (Spain). *European journal of epidemiology* 8, 553–559. <https://doi.org/10.1007/BF00146376>
- Masucci, L., Graffeo, R., Bani, S., Bugli, F., Boccia, S., Nicolotti, N., Fiori, B., Fadda, G., Spanu, T., 2011. Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 may 2006 to 31 december 2008. *Eurosurveillance* 16, 19891. <https://doi.org/10.2807/ese.16.24.19891-en>
- 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, 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, 635–646. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001697>
- Mehlhorn, H., 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species?. *Parasitology Research* 74, 393–5. <https://doi.org/10.1007/BF00539464>
- Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noël, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Chabé, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Fiori, P.L., El Alaoui, H., Viscogliosi, E., 2012. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitology International* 61, 719–722. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.05.012>
- Meloni, D., Sancier, 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, 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, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.007>
- Messaad, S.A., Laboudi, M., Moumni, M., Sarhane, B., Belghyti, D., El-Kharrim, K., 2014. Children intestinal parasites related to socio-economic factors in Salé hospital, Morocco. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8, 833–840.
- Minvielle, M.C., Pezzani, B.C., Cordoba, M.A., De Luca, M.M., Apezteguia, M.C., Basualdo, J.A., 2004. Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *The Korean journal of parasitology* 42, 121–127. <https://doi.org/10.3347/kjp.2004.42.3.121>
- Mirjalali, H., Latifi, A., Taghipour, A., Yadegar, A., Hatami, B., Sadeghi, A., Ehsani, M.J., Zali, M.R., 2020. Association between *Blastocystis* and body mass index in healthy subjects; a theoretical pilot study. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 19, 129–134. <https://doi.org/10.1007/s40200-019-00483-2>
- Mirza, H., Tan, K.S.W., 2009. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research* 104, 355–361. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1203-1>
- Mirza, H., Wu, Z., Kidwai, F., Tan, K.S.W., 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, 5019–5026. <https://doi.org/10.1128/IAI.05632-11>
- Mirza, H., Wu, Z., Teo, J.D.W., Tan, K.S.W., 2012. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cellular microbiology* 14, 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., Chen, X.Q., Ng, G.C., Yap, E.H., 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* 83, 319–325. <https://doi.org/10.1007/s004360050256>
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Yap, E.H., 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research* 85, 103–108. <https://doi.org/10.1007/s004360050517>
- 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, 439–444. <https://doi.org/10.1007/s004360050142>
- Moghaddam, D.D., Ghadirian, E., Azami, M., 2005. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitology Research* 96, 273–275. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1363-1>
- Mohamed, A.M., Ahmed, M.A., Ahmed, S.A., Al-Semany, S.A., Alghamdi, S.S., Zagloul, D.A., 2017. Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infectious agents and cancer* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0131-z>
- Mohamed, R.T., El-Bali, M.A., Mohamed, A.A., Abdel-Fatah, M.A., El-Malky, M.A., Mowafy, N.M., Zaghloul, D.A., Bakri, R.A., Al-Harhi, S.A., 2017. Subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. *Parasites and Vectors* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2114-8>
- 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 and Vectors* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04225-9>
- Mohapatra, S., Singh, D.P., Alcid, D., Pitchumoni, C.S., 2018. Beyond O&P Times Three. *American Journal of Gastroenterology* 113, 805–818. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0083-y>
- Mohemmi, N., Moradi, M., Khalilian, A., Maghsood, A.H., Fallah, M., 2015. The relationship between *Blastocystis hominis* infection and Irritable Bowel Syndrome (IBS) and comparing direct wet mount, stool culture, Formalin-Ether and trichrome staining procedures for identifying organisms. *Hormozgan Medical Journal* 19, 77–84.
- Mohtashamipour, M., Ghaffari Hoseini, S., Pestehchian, N., Yousefi, H., Fallah, E., Hazratian, T., 2015. Intestinal parasitic infections in patients with diabetes mellitus: a case-control study. *Journal of Analytical Research in Clinical Medicine* 3, 157–163. <https://doi.org/10.15171/jarcm.2015.025>
- Monjaraz, E.M.T., Luna, M.A.V., Barrios, E.M., Bustamante, R.C., Mondragón, F.Z., Anaya, A.H., León, J.C., Mendez, M.C., Ugalde, M.L., Ramirez Mayans, J.A., 2018. *Blastocystis hominis* and chronic abdominal pain in children: Is there an association between them?. *Journal of Tropical Pediatrics* 64, 279–283. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmx060>
- Moosavi, A., Haghighi, A., Nazemalhosseini Mojarad, E., Zayeri, F., Alebouyeh, M., Khazan, H., Kazemi, B., Zali, M.R., 2012. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitology research* 111, 2311–2315. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3085-5>
- Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., 2022. Simultaneous detection of less frequent waterborne parasitic protozoa in reused wastewater using amplicon sequencing and qPCR techniques. *Journal of Environmental Management* 314, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115029>
- Motazedian, H., Ghasemi, H., Sadjjadi, S., 2008. Genomic diversity of *Blastocystis hominis* from patients in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102, 85–8. <https://doi.org/10.1179/136485908X252197>
- Muadica, A.S., Köster, P.C., Dashti, A., Bailo, B., Hernández-De-mingo, M., Balasegaram, S., Carmena, D., 2021. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* sp. in symptomatic and asymptomatic schoolchildren in Zambézia province (Mozambique). *Pathogens* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030255>
- Muadica, A.S., Köster, P.C., Dashti, A., Bailo, B., Hernández-de-Mingo, M., Reh, L., Balasegaram, S., Verlander, N.Q., Chércoles, E.R., Carmena, D., 2020. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms*. 8, 446. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8040466>
- Muhsen, K., Levine, M.M., 2012. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clinical Infectious Diseases* 55, S271-S293. <https://doi.org/10.1093/cid/cis762>
- 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, 584–592. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00322-y>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 51, 263–273.
- Muñoz, V., Lizarazu, P., Limache, G., Condori, D., 2008. Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en adultos mayores del hogar San Ramón, Ciudad de La Paz, Bolivia. *Biofarbo* 16, 9–15.
- Nagel, R., Cuttall, L., Stensvold, C.R., Mills, P.C., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R.J., 2012. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Internal Medicine Journal* 42, 1187–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02626.x>
- Nagel, R., Gray, C., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R.J., 2015a. Features of *Blastocystis* spp. in

- xenic culture revealed by deconvolutional microscopy. *Parasitology Research* 114, 3237–3245. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4540-x>
- Nagel, R., Traub, R.J., Kwan, M.M.S., Bielefeldt-Ohmann, H., 2015b. Blastocystis specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasites and Vectors* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1069-x>
- Nakamura, Y., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Kamaishi, T., Nakamura, F., Okamoto, K.I., Hasegawa, M., 1996. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 α . *Molecular and Biochemical Parasitology* 77, 241–245. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02600-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02600-X)
- Nascimento, S., Moitinho Mda, L., 2005. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47, 213–217.
- Navone, G.T., Gamboa, M.I., Kozubsky, L.E., Costas, M.E., Cardozo, M.S., Sisliauskas, M.N., González, M., 2005. Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. *Parasitología Latinoamericana* 60, 178–181. <https://doi.org/10.4067/s0717-77122005000200014>
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Nigro, L., Larocca, L., Massarelli, L., Patamia, I., Minniti, S., Palermo, F., Cacopardo, B., 2003. A Placebo-Controlled Treatment Trial of *Blastocystis hominis* Infection with Metronidazole. *Journal of Travel Medicine* 10, 128–130. <https://doi.org/10.2310/7060.2003.31714>
- Nimri, L.F., 1993. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2706–2708. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.10.2706-2708.1993>
- Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of clinical microbiology* 43, 348–355. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.348-355.2005>
- Noël, C., Peyronnet, C., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Sogin, M.L., Capron, M., Viscogliosi, E., Zenner, L., 2003. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126, 119–123. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00246-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00246-3)
- Noor Azian, M.Y., San, Y.M., Gan, C.C., Yusri, M.Y., Nurulsyamzawaty, Y., Zuhaizam, A.H., Maslawaty, M.N., Norparina, I., Vythilingam, I., 2007. Prevalence of intestinal protozoa in an aborigine community in Pahang, Malaysia. *Tropical biomedicine* 24, 55–62.
- Noradilah, S.A., Lee, I.L., Anuar, T.S., Salleh, F.M., Abdul Manap, S.N.A., Husnie, N.S., Azrul, S.M., Moktar, N., 2017a. *Blastocystis* spp. Contaminated water sources in aboriginal settlements. *Tropical Biomedicine* 34, 110–117.
- Noradilah, S.A., Moktar, N., Anuar, T.S., Lee, I.L., Salleh, F.M., Manap, S.N.A.A., Mohtar, N.S.H.M., Azrul, S.M., Abdullah, W.O., Nordin, A., Abdullah, S.R., 2017b. Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: Does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community?. *Parasites and Vectors* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2294-2>
- Not, A., Salvador, F., Goterris, L., Sulleiro, E., López, I., Balladares, M., García, E., Paz, C., Sánchez-Montalvá, A., Bosch-Nicolau, P., Sao-Avilés, A., Molina, I., 2020. Microscopic examination after concentration techniques for *Blastocystis* sp. detection in serial faecal samples: How many samples are needed?. *Parasite Epidemiology Control* 9, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00137>
- 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, e111868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111868>
- O'Connell, E., Nutman, T., 2015. Eosinophilia in Infectious Diseases. *Immunology and Allergy Clinics* 35, 493–522. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.05.003>.
- O'gorman, M.A., Orenstein, S.R., Proujansky, R., Wadowsky, R.M., Putnam, P.E., Kocoshis, S.A., 1993. Prevalence and Characteristics of Blastocystis hominis Infection in Children. *Clinical Pediatrics* 32, 91–96. <https://doi.org/10.1177/000992289303200206>
- 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. Características clínicas y epidemiológicas de la parasitación intestinal por Blastocystis hominis. *Revista Clínica Española* 218, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.01.003>
- Oliveira-Arbex, A.P., David, É.B., da Silva Tenório, M., Cicchi, P.J.P., Patti, M., Coradi, S.T., Lucheis, S.B., Jim, J., Guimarães, S., 2019. Diversity of Blastocystis subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 78, 104053. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104053>
- Oliveira-Arbex, A.P., David, É.B., Guimarães, S., 2018. Infection, genetics and evolution Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 57, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.005>
- Oliveira, D., Ferreira, F.S., Atouguia, J., Fortes, F., Guerra, A., Centeno-Lima, S., 2015. Infection by intestinal parasites, stunting and anemia in school-aged children from southern Angola. *PLoS One* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137327>
- Olsen, G., 1990. Gary Olsen's Interpretation of the "Newick's 8:45" Tree Format Standard.
- 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, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106577>
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F., Favennec, L., Hamze, M., Viscogliosi, E., Certad, G., 2016. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with Cryptosporidium, Giardia, Blastocystis and Dientamoeba among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004496>
- 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, 1–14. <https://doi.org/10.3390/biology10070669>
- Östan, I., Kilimcioğlu, A.A., Girginkardeşler, N., Özyurt, B.C., Limoncu, M.E., Ok, Ü.Z., 2007. Health inequities: Lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. *BMC Public Health* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-342>
- Özyurt, M., Kurt, Ö., Mølbak, K., Nielsen, H.V., Haznedaroglu, T., Stensvold, C.R., 2008. Molecular epidemiology of Blastocystis infections in Turkey. *Parasitology International* 57, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.01.004>
- Parija, S., Jeremiah, S., 2013. Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology* 3, 17. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113894>
- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., Thompson, R.C.A., 2007. Direct characterization of Blastocystis from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134, 359–367. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001582>

- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., Thompson, R.C.A., 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology* 169, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.032>
- Paschke, C., Apelt, N., Fleischmann, E., Perona, P., Walentiny, C., Löscher, T., Herbinger, K.H., 2011. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 1194–1200. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03414.x>
- 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, 993–1002. <https://doi.org/10.1111/zph.12522>
- Piekara-Stępińska, A., Gorczykowski, M., Piekarska, J., 2018. Suitability of selected culture media for *Blastocystis* spp. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 21, 815–817. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2018.125593>
- Pintong, A. rada, Sunyanusin, S., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Sukthana, Y., Popruk, S., 2018. *Blastocystis* subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology International* 67, 824–828. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.08.009>
- Piranshahi, A.R., Tavalla, M., Khademvatan, S., 2018. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* isolates in patients with HIV-positive using locus SSU-rDNA. *Journal of Parasitic Diseases* 42, 28–33. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0957-8>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, A.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, 975–983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivares, C.P., Delbac, F., El, A.H., 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS pathogens* 8, e1002545. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>
- Popruk, N., Prasongwattana, S., Mahittikorn, A., Palasuwan, A., Popruk, S., Palasuwan, D., 2020. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* infection in patients with diabetes mellitus in Thailand. *International journal of environmental research and public health* 17, 8877. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238877>
- Popruk, S., Udonsom, R., Koombapong, K., Mahittikorn, A., Kusolsuk, T., 2015. Subtype Distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar. *The Korean journal of parasitology* 53, 13–19.
- Poulsen, C.S., Efunshile, A.M., Nelson, J.A., Stensvold, C.R., 2016. Epidemiological Aspects of *Blastocystis* Colonization in Children in Ilero, Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6, 175–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0074>
- Puthia, M.K., Lu, J., Tan, K.S.W., 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF- κ B-dependent manner. *Eukaryotic Cell* 7, 435–443. <https://doi.org/10.1128/EC.00371-07>
- Quílez, J., Clavel, A., Sanchez-Acedo, C., Causape, A.C., 1995a. Detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Aragón (Spain). *Veterinary Parasitology* 56, 345–348. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00682-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00682-3)
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., Causapé, A.C., 1995b. Occurrence of *Blastocystis* sp. in cattle in Aragón, northeastern Spain. *Parasitology research* 81, 703–705.
- Rahimi, H.M., Karamati, S.A., Nemati, S., Mirjalali, H., Zali, M.R., 2022. Molecular Identification, Subtypes Distribution, and Alleles Discrimination of *Blastocystis* sp., Isolated from Immunocompromised Subjects in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 17, 184–193.

- <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i2.9534>
- Rajamanikam, A., Hooi, H.S., Kudva, M., Samudi, C., Kumar, S., 2019. Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: A pathogenic consequence. *PLoS One* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212542>
- Ramírez, J.D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M.C., Giraldo, J.C., 2017. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172586>
- 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* 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* 22, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>
- Rasti, S., Hassanzadeh, M., Hooshyar, H., Momen-Heravi, M., Mousavi, S.G.A., Abdoli, A., 2017. Intestinal parasitic infections in different groups of immunocompromised patients in Kashan and Qom cities, central Iran. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52, 738–741. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1308547>
- Rayan, P., Verghese, S., McDonnell, P.A., 2010. Geographical location and age affects the incidence of parasitic infestations in school children. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 53, 498. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.68292>
- Rebolla, M.F., Silva, E.M., Gomes, J.F., Falcão, A.X., Rebolla, M.V.F., Franco, R.M.B., 2016. High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 58. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658031>
- Reh, L., Muadica, A.S., Köster, P.C., Balasegaram, S., Verlander, N.Q., Chércoles, E.R., Carmena, D., 2019. Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Eurosurveillance* 24, 1900241.
- Rene, B., Stensvold, C., Badsberg, J., Nielsen, H., 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80, 588–92.
- Rezaei Riabi, T., Mirjalali, H., Haghghi, 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* 61, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.026>
- Rivera, W.L., 2008. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. *Veterinary Parasitology* 156, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.001>
- Rivera, W.L., Tan, M.A. V., 2005. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitology Research* 96, 253–257. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1344-4>
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D., 2011. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of *Blastocystis* sp. in clinical stool samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84, 308. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
- Roberts, T., Ellis, J., Harkness, J., Marriott, D., Stark, D., 2014a. Treatment failure in patients with chronic *Blastocystis* infection. *Journal of medical microbiology* 63, 252–257. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065508-0>
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2014b. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut pathogens* 6, 1–9.

- <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-17>
- Roberts, T, Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2013. Subtype distribution of Blastocystis isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of Blastocystis. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases* 32, 335–343. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1746-z>
- Roberts, Tamalee, Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2013. Subtype distribution of Blastocystis isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Veterinary Parasitology* 196, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.011>
- Robinson, G.L., 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62, 285–294. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(68\)90170-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(68)90170-3)
- Robles-Cabrera, M.X., Maguiña, J.L., Gonzales-Huerta, L., Panduro-Correa, V., Dámaso-Mata, B., Pecho-Silva, S., Navarro-Solsol, A.C., Rabaan, A.A., Rodríguez-Morales, A.J., Arteaga-Livias, K., 2021. Blastocystis species and gastrointestinal symptoms in peruvian adults attended in a public hospital. *Infection and Chemotherapy* 53, 374–380. <https://doi.org/10.3947/IC.2021.0004>
- Rojas-Velázquez, L., Maloney, J.G., Molokin, A., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., González, E., Pérez-Juárez, H., Ximénez, C., Santin, M., 2019. Use of next-generation amplicon sequencing to study Blastocystis genetic diversity in a rural human population from Mexico. *Parasites and Vectors* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3814-z>
- Rossignol, J.F., Kabil, S.M., Said, M., Samir, H., Younis, A.M., 2005. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with Blastocystis hominis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3, 987–991. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00427-1](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00427-1)
- Rostami, A., Riahi, S.M., Haghighi, A., Saber, V., Armon, B., Seyyedtabaei, S.J., 2017. The role of Blastocystis sp. and Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology research* 116, 2361–2371. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5535-6>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., Sánchez-Gracia, A., 2017. Dna SP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular biology and evolution* 34, 3299–3302.
- Ruau, C.G., Stang, B. V., 2014. Prevalence of Blastocystis in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS One* 9, e107496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107496>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Waleron, M., Kalicki, M., Sikorska, K., Szostakowska, B., 2021. Molecular characterization of Blastocystis from animals and their caregivers at the Gdańsk zoo (Poland) and the assessment of zoonotic transmission. *Biology* 10, 984. <https://doi.org/10.3390/biology10100984>
- 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* 75, 103926. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>
- Rychert, J., 2019. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infection and Epidemiology* 2, 1–5. <https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>
- 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 and Infectious Diseases* 27, 81–83. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0404-3>
- Sahimin, N., Meor Termizi, F.H., Rajamanikam, A., Mohd Nazri, N.A., Govind, S.K., Mohd Zain, S.N., 2020. Prevalence and subtypes of Blastocystis among migrant workers from different working sectors in Peninsular Malaysia. *Parasitology Research* 119, 3555–3558.

- <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06865-3>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406–25.
- Salazar-Sánchez, R.S., Ascuña-Durand, K., Ballón-Echegaray, J., Vásquez-Huerta, V., Martínez-Barrios, E., Castillo-Neyra, R., 2021. Socio-demographic determinants associated with Blastocystis infection in arequipa, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 104, 700–707. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0631>
- Salinas, J., Gonzales, H.V., 2007. Infección por Blastocystis. *Revista de Gastroenterología del Peru* 27, 264–274.
- Salman, Y.J., 2015. Detection of Blastocystis hominis among Peoples in Kirkuk Province Using ELISA and Direct Microscopy Blastocystis hominis is the most common. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 686–695.
- 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, 340. <https://doi.org/10.3390/biology10040340>
- Salvador, F., Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Alonso, C., Santos, J., Fuentes, I., Molina, I., 2016. Epidemiological and clinical profile of adult patients with Blastocystis sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasites and Vectors* 9, 548. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1827-4>
- Sanad, M.M., Darwish, A., Yousef, S.M., Nassef, N.E., 1991. Blastocystis hominis: laboratory identification and clinical relevance. *Journal of Tropical Medicine* 1, 61–70.
- 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, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>
- Sarzhanov, F., Dogruman-Al, F., Santin, M., Maloney, J.G., Gureser, A.S., Karasartova, D., Taylan-Ozkan, A., 2021. Investigation of neglected protists Blastocystis sp. and Dientamoeba fragilis in immunocompetent and immunodeficient diarrheal patients using both conventional and molecular methods. *PLoS neglected tropical diseases* 15, e0009779. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009779>
- Scanlan, P.D., 2012. Blastocystis: Past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology* 28, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.001>
- Scanlan, P.D., Knight, R., Song, S.J., Ackermann, G., Cotter, P.D., 2016. Prevalence and genetic diversity of Blastocystis in family units living in the United States. *Infection, Genetics and Evolution* 45, 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.018>
- Scanlan, P.D., Marchesi, J.R., 2008. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: Qualitative assessment using culture-dependent and - independent analysis of faeces. *The ISME journal* 2, 1183–1193. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.76>
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Cotter, P.D., 2015. Development and Application of a Blastocystis Subtype-Specific PCR Assay Reveals that Mixed-Subtype Infections Are Common in a Healthy Human Population. *Applied and environmental microbiology* 81, 4071–4076. <https://doi.org/10.1128/AEM.00520-15>
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., 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, 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, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>
- 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, 1–3. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759086>

- Sekar, U., Shanthi, M., 2013. Blastocystis: Consensus of treatment and controversies. *Tropical Parasitology* 3, 35. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113901>
- Senay, H., MacPherson, D., 1990. Blastocystis hominis: Epidemiology and natural history. *Journal of Infectious Diseases* 162, 987–990. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.4.987>
- 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, 1164. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0706>
- Sheehan, D.J., Raucher, B.G., McKittrick, J.C., 1986. Association of Blastocystis hominis with signs and symptoms of human disease. *Journal of clinical microbiology* 24, 548–550.
- Shirvani, G., Fasihi-Harandi, M., Raiesi, O., Bazargan, N., Zahedi, M.J., Sharifi, I., Kalantari-Khandani, B., Nooshadokht, M., Shabandoust, H., Mohammadi, M.A., Ebrahimipour, M., Babaei, Z., 2020. Prevalence and molecular subtyping of Blastocystis from patients with irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and chronic urticaria in Iran. *Acta parasitologica* 65, 90–96. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00131-y>
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., Clark, C.G., 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* 380, 398. <https://doi.org/10.1038/380398a0>
- Singh, A., Priyadarshi, K., Rai, T., Banerjee, T., 2019. A case report of Blastocystis infection and Steven Johnson's syndrome. *Tropical Biomedicine* 36, 987–992.
- 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, 446–450. <https://doi.org/10.1007/BF00931510>
- Sio, S.W.S., Puthia, M.K., Lee, A.S.Y., Lu, J., Tan, K.S.W., 2006. Protease activity of Blastocystis hominis. *Parasitology Research* 99, 126–130. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0131-1>
- Smith, H., Nichols, R., 2006. Zoonotic protozoa--food for thought. *Parassitologia*. 48, 101–4.
- Souppart, L., Moussa, H., Cian, A., Sancier, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Delbac, F., Boorom, K., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Viscogliosi, E., 2010. Subtype analysis of Blastocystis isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitology research* 106, 505–511. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1693-5>
- 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, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1398-9>
- Srichaipon, N., Nuchprayoon, S., Charuchaibovorn, S., Sukkapan, P., Sanprasert, V., 2019. A simple Genotyping method for Rapid Differentiation of Blastocystis Subtypes and Subtype Distribution of Blastocystis spp. In Thailand. *Pathogens* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010038>
- Stensvold, C.R., 2013a. Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for Blastocystis subtyping. *Journal of clinical microbiology* 51, 190–194. <https://doi.org/10.1128/JCM.02541-12>
- Stensvold, C.R., 2013b. Blastocystis: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Tropical parasitology* 3, 26. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113896>
- Stensvold, C.R., 2012. Thinking Blastocystis out of the box. *Trends in Parasitology* 28, 305. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.004>
- Stensvold, C.R., Ahmed, U.N., Andersen, L.O.B., 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, 1847–1851. <https://doi.org/10.1128/JCM.00007-12>
- Stensvold, C.R., Alfellani, M., Clark, C.G., 2012b. Levels of genetic diversity vary dramatically between Blastocystis subtypes. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.002>
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H. V., Clark, C.G., 2009a. Subtype distribution of Blastocystis isolates from

- synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International journal for parasitology* 39, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006>
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., Nielsen, H. V., 2007a. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 59, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Nielsen, H. V., Bada, A., Thorsen, S., 2008. Symptomatic infection with *Blastocystis* sp. subtype 8 successfully treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102, 271–274. <https://doi.org/10.1179/136485908X278847>
- Stensvold, C.R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., Arendrup, M.C., 2006. Detection of *Blastocystis* homings in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology* 92, 1081–1087. <https://doi.org/10.1645/GE-840R.1>
- Stensvold, C.R., Christiansen, D.B., Olsen, K.E.P., Nielsen, H. V., 2011a. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84, 883. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005>
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2020. Pre-empting Pandora’s Box: *Blastocystis* Subtypes Revisited. *Trends in Parasitology* 36, 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.009>
- Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology international* 65, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C.R., Jirků-Pomajbíková, K., Tams, K.W., Jokelainen, P., Berg, R.P.K.D., Marving, E., Petersen, R.F., Andersen, L.O., Angen, Ø., Nielsen, H.V., 2021. Parasitic intestinal protists of zoonotic relevance detected in pigs by metabarcoding and real-time PCR. *Microorganisms* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061189>
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E.P., Arendrup, M.C., Nielsen, H., Mølbak, K., 2009b. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiology and Infection* 137, 1655–1663.
- Stensvold, C.R., Nielsen, S.D., Badsberg, J.H., Engberg, J., Friis-Møller, N., Nielsen, S.S., Nielsen, H. V., Friis-Møller, A., 2011b. The prevalence and clinical significance of intestinal parasites in HIV-infected patients in Denmark. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 43, 129–135. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.524659>
- Stensvold, C.R., Nielsen, H. V., Mølbak, K., Smith, H. V., 2009c. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends in parasitology* 25, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.010>
- Stensvold, C.R., Smith, H. V., Nagel, R., Olsen, K.E.P., Traub, R.J., 2010. Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: Reality or delusion?. *Journal of Clinical Gastroenterology* 44, 85–90. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181bb86ba>
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G., 2007b. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in parasitology* 23, 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, 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.A., 2007c. *Blastocystis*: Subtyping isolates using pyrosequencingTM technology. *Experimental Parasitology* 116, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.002>
- Stensvold, C.R., van der Giezen, M., 2018. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 34, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.004>
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F.L., 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology*

- Reviews 9, 563–584. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.4.563-584.1996>
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F.L., 1991. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* 21, 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.L., McDougall, R., 1991. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *International Journal for Parasitology* 21, 807–812. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90149-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90149-2)
- Stenzel, D.J., Cassidy, M.F., Boreham, P.F.L., 1993. Morphology of *Blastocystis* sp. isolated from circus animals. *International Journal for Parasitology* 23, 685–687. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90179-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90179-3)
- Suresh, K., Chong, S., Howe, J., Ho, L., Ng, G., Yap, E., Singh, M., 1995. Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats. *International journal for parasitology* 25, 123–6. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00074-x](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00074-x)
- Suresh, K., Howe, J., Chong, S., Ng, G., Ho, L., Loh, A., Ramachandran, N., Yap, E., Singh, M., 1994. Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 80, 327–35. <https://doi.org/10.1007/BF02351875>
- 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, 456–460. <https://doi.org/10.1007/BF00931582>
- Suresh, K., Rajah Salim, H., Jamaiah, I., Khairul Anuar, A., 2001. *Blastocystis hominis* in high-rise flat dwellers in Kuala Lumpur, Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 377–378. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90186-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90186-5)
- Suresh, K., Smith, H., 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23, 509–511. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1123-7>
- Sylla, K., Sow, D., Lelo, S., Dieng, T., Tine, R.C., Faye, B., 2022. *Blastocystis* sp. Infection: Prevalence and Clinical Aspects among Patients Attending to the Laboratory of Parasitology–Mycology of Fann University Hospital, Dakar, Senegal. *Parasitologia* 2, 292–301. <https://doi.org/10.3390/parasitologia2040024>
- Tahvildar-Biderouni, F., Salehi, N., 2014. Detection of *Cryptosporidium* infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 7, 125–130.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tan, H., Zierdt, C.H., 1973. Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 23, 315–324. <https://doi.org/10.1007/BF00328892>
- Tan, H.K., Harrison, M., Zierdt, C.H., 1974. Freeze-etch studies of the granular and vacuolated forms of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 44, 267–278. <https://doi.org/10.1007/BF00366110>
- Tan, K.S.W., 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical microbiology reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>
- Tan, K.S.W., 2004. *Blastocystis* in humans and animals: New insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology* 126, 121–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.017>
- Tan, K.S.W., Howe, J., Yap, E.H., Singh, M., 2001. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? *Parasitology Research* 87, 362–367. <https://doi.org/10.1007/s004360000364>
- Tan, K.S.W., Mirza, H., Teo, J.D.W., Wu, B., MacAry, P.A., 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current Infectious Disease Reports* 12, 28–35. <https://doi.org/10.1007/s11908-009-0073-8>

- Tan, K.S.W., Singh, M., Yap, E.H., 2002. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: Hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology* 32, 789–804. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00005-X)
- Tan, S.W., Singh, M., Yap, E.H., Ho, L.C., Moe, K.T., Howe, J., Ng, G.C., 1996. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitology Research* 82, 375–377. <https://doi.org/10.1007/s004360050130>
- Tan, T.C., Ong, S.C., Suresh, K.G., 2009. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitology research* 105, 1283–1286. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1551-5>
- Tan, T.C., Suresh, K.G., 2006a. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research* 98, 189–193. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0033-7>
- Tan, T.C., Suresh, K.G., 2006b. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - A detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research* 99, 737–742. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0214-z>
- Tan, T.C., Suresh, K.G., Smith, H. V., 2008. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitology Research* 104, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1163-5>
- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., Mungthin, M., 2004. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitology Research* 93, 445–447. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1157-x>
- Thathaisong, U., Worapong, J., Mungthin, M., Tan-Ariya, P., Viputtigul, K., Sudatis, A., Noonai, A., Leelayoova, S., 2003. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 967–975. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.967-975.2003>
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Torgerson, P.R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A.L., Kasuga, F., Rokni, M.B., Zhou, X.N., Fèvre, E.M., Sripan, B., Gargouri, N., Fürst, T., Budke, C.M., Carabin, H., Kirk, M.D., Angulo, F.J., Havelaar, A., de Silva, N., 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS medicine* 12, e1001920. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001920>
- Torres, P., Miranda, J.C., Flores, L., Riquelme, J., Franjola, R., Perez, J., Auad, S., Hermosilla, C., Riquelme, S., 1992. Blastocistosis y otras infecciones por protozoos intestinales en comunidades humanas ribereñas de la cuenca del río Valdivia, Chile. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651992000600010>
- Upcroft, J.A., Dunn, L.A., Dommett, L.S., Healey, A., Upcroft, P., Boreham, P.F.L., 1989. Chromosomes of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* 19, 879–883. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90114-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90114-8)
- Urwin, R., Maiden, M.C.J., 2003. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* 11, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
- Valença Barbosa, C., De Jesus Batista, R., Pereira Igreja, R., D'Avila Levy, C.M., Werneck De Macedo, H., Carneiro Santos, H.L., 2017. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites and Vectors* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2458-0>
- Valsecchi, R., Leghissa, P., Greco, V., 2004. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. *Acta Dermato-Venereologica* 84, 322–323. <https://doi.org/10.1080/00015550410025949>
- Van Gool, T., Weijts, R., Lammerse, E., Mank, T.G., 2003. Triple faeces test: An effective tool for

- detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22, 284–290. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0919-1>
- Van Hellemond, J.J., Molhoek, N., Koelewijn, R., Wismans, P.J., Van Genderen, P.J.J., 2013. Is paromomycin the drug of choice for eradication of Blastocystis in adults?. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19, 545–548. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0496-2>
- Vargas-Sanchez, G.B., Romero-Valdovinos, M., Ramirez-Guerrero, C., Vargas-Hernandez, I., Ramirez-Miranda, M.E., Martinez-Ocaña, J., Valadez, A., Ximenez, C., Lopez-Escamilla, E., Hernandez-Campos, M.E., Villalobos, G., Martinez-Hernandez, F., Maravilla, P., 2015. Blastocystis isolates from patients with irritable bowel syndrome and from asymptomatic carriers exhibit similar parasitological loads, but significantly different generation times and genetic variability across multiple subtypes. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124006>
- Vdovenko, A.A., 2000. Blastocystis hominis: Origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research* 86, 8–10. <https://doi.org/10.1007/PL00008506>
- 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, 162–164. <https://doi.org/10.1007/s004360050528>
- 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, 469–471. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.009>
- Wakid, M.H., Aldahhasi, W.T., Alsulami, M.N., El-Kady, A.M., Elshabrawy, H.A., 2022. Identification and Genetic Characterization of Blastocystis Species in Patients from Makkah, Saudi Arabia. *Infection and Drug Resistance* 15, 491–501. <https://doi.org/10.2147/IDR.S347220>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Bhutta, Z.A., Carter, A., Bell, M.L., 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)
- Wang, K.X., Li, C.P., Wang, J., Cui, Y.B., 2002. Epidemiological survey of Blastocystis hominis in Huainan City, Anhui Province, China. *World Journal of Gastroenterology* 8, 928. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i5.928>
- Warnow, T., 2012. Standard maximum likelihood analyses of alignments with gaps can be statistically inconsistent. *PLoS currents* 4, RRN1308.
- 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, 167–178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>
- Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K.S.W., Delbac, F., El Alaoui, H., 2012. Characterization of two cysteine proteases secreted by Blastocystis ST7, a human intestinal parasite. *Parasitology International* 61, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.02.007>
- Wibowo, M.C., Yang, Z., Borry, M., Hübner, A., Huang, K.D., Tierney, B.T., Zimmerman, S., Barajas-Olmos, F., Contreras-Cubas, C., García-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Lubner, J.M., Kirstahler, P., Blohm, T., Smiley, F.E., Arnold, R., Ballal, S.A., Pamp, S.J., Russ, J., Maixner, F., Rota-Stabelli, O., Segata, N., Reinhard, K., Orozco, L., Warinner, C., Snow, M., LeBlanc, S., Kostic, A.D., 2021. Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut. *Nature* 594, 234–239. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03532-0>
- Windsor, J.J., Macfarlane, L., Hughes-Thapa, G., Jones, S.K.A., Whiteside, T.M., 2002. Incidence of Blastocystis hominis in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *British journal of biomedical science* 59, 154–157.

- <https://doi.org/10.1080/09674845.2002.11783653>
- Wong, K.H.S., Ng, G.C., Lin, R.T.P., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., Tan, K.S.W., 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research* 102, 663–670. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0808-0>
- Wylezich, C., Belka, A., Hanke, D., Beer, M., Blome, S., Höper, D., 2019. Metagenomics for broad and improved parasite detection: a proof-of-concept study using swine faecal samples. *International Journal for Parasitology* 49, 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.04.007>
- Wylezich, C., Caccio, S.M., Walochnik, J., Beer, M., Höper, D., 2020. Untargeted metagenomics shows a reliable performance for synchronous detection of parasites. *Parasitology Research* 119, 2623–2629. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06754-9>
- Yaicharoen, R., Ngrenngarmert, W., Wongjindanon, N., Sripochang, S., Kiatfuengfoo, R., 2006. Infection of *Blastocystis hominis* in primary schoolchildren from Nakhon Pathom province, Thailand. *Tropical biomedicine* 23, 117–122.
- Yakoob, J., Abbas, Z., Usman, M.W., Sultana, A., Islam, M., Awan, S., Ahmad, Z., Hamid, S., Jafri, W., 2014. Cytokine changes in colonic mucosa associated with *Blastocystis* spp. subtypes 1 and 3 in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Parasitology* 141, 957–969. <https://doi.org/10.1017/S003118201300173X>
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R., 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 106, 1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1761-x>
- Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X., Luo, X., Chen, G., 2006. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitology Research* 99, 597–601. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0186-z>
- Yan, Y., Su, S., Ye, J., Lai, X., Lai, R., Liao, H., Chen, G., Zhang, R., Hou, Z., Luo, X., 2007. *Blastocystis* sp. subtype 5: A possibly zoonotic genotype. *Parasitology Research* 101, 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0672-y>
- 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, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0644-3>
- 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, 1324–1330. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.4.1324-1330.2000>
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E.H., Singh, M., Takahashi, Y., 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and cellular probes* 12, 153–159.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y., 2004a. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research* 92, 22–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Pandey, K., Pandey, B.D., Sherchand, J.B., Yanagi, T., Kanbara, H., 2009. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Veterinary parasitology* 160, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.029>
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., Kimata, I., 2004b. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research* 94, 391–396. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1230-5>
- Yowang, A., Tsaousis, A.D., Chumphonsuk, T., Thongsin, N., Kullawong, N., Popluechai, S., Gentekaki, E., 2018. High diversity of *Blastocystis* subtypes isolated from asymptomatic adults living in Chiang Rai, Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 65, 270–275.

- <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.08.010>
- Zaman, V., Howe, J., Ng, M., 1997. Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 83, 731–733. <https://doi.org/10.1007/s004360050329>
- Zaman, V., Howe, J., Ng, M., 1995. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitology Research* 81, 465–469. <https://doi.org/10.1007/BF00931787>
- Zhang, S.X., Carmena, D., Ballesteros, C., Yang, C.L., Chen, J.X., Chu, Y.H., Yu, Y.F., Wu, X.P., Tian, L.G., Serrano, E., 2021. Symptomatic and asymptomatic protist infections in hospital in patients in southwestern China. *Pathogens* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060684>
- Zhang, W., Ren, G., Zhao, W., Yang, Z., Shen, Y., Sun, Y., Liu, A., Cao, J., 2017. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and subtyping of *Blastocystis* in cancer patients: Relationship to Diarrhea and assessment of zoonotic transmission. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01835>
- Zhang, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., Zhao, L., Liu, Y., Fan, X., 2012. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 110, 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2607-x>
- 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, 2327–2333. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5506-y>
- Zierdt, C.H., 1991a. *Blastocystis hominis*-Past and Future 4, 61–79.
- Zierdt, C.H., 1991b. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 662–663. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.3.662-663.1991>
- Zierdt, C.H., 1988. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitology Today* 4, 15–17. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90049-X)
- Zierdt, C.H., 1986. Cytochrome-free mitochondria of an anaerobic protozoan--*Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology* 33, 67–9. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05559.x>
- Zierdt, C.H., 1973. Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology* 20, 114–21.
- Zierdt, C.H., Rude, W.S., Bull, B.S., 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Clinical Pathology* 48, 495–501.
- Zierdt, C.H., Swan, J.C., 1981. Generation Time and Growth Rate of the Human Intestinal Parasite *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology* 28, 483–485. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1981.tb05324.x>
- Zierdt, C.H., Tan, H.K., 1976. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. *Experimental Parasitology* 39, 422–30. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(76\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(76)90046-1)
- Zierdt, C.H., Williams, R.L., 1974. *Blastocystis hominis*: Axenic cultivation. *Experimental Parasitology* 36, 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., Zierdt, W.S., Nagy, B., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *Journal of Parasitology* 81, 127–129. <https://doi.org/10.2307/3284026>