



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina
Programa de doctorado en Medicina (3139)

TESIS DOCTORAL

ENTEROPARASITOSIS ASOCIADAS A TRASTORNOS INTESTINALES CRÓNICOS

Autora:

Susana Cifre Martínez
Graduada en Nutrición Humana y Dietética

Directores:

María Trelis Villanueva
Juan Francisco Merino Torres
José Miguel Soriano del Castillo

Valencia, julio de 2021



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Los abajo firmantes, **Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA**, Profesora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia, **Dr. JUAN FRANCISCO MERINO TORRES**, Profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y **Dr. JOSÉ MIGUEL SORIANO DEL CASTILLO**, Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Valencia, por la presente:

CERTIFICAN: que Doña SUSANA CIFRE MARTÍNEZ ha realizado íntegramente la Tesis Doctoral titulada “ENTEROPARASITOSIS ASOCIADAS A TRASTORNOS INTESTINALES CRÓNICOS” en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia, con el fin de optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia a **9 de junio de 2021**.

Fdo.:
María Trelis Villanueva

Fdo.:
J. Francisco Merino Torres

Fdo.:
José M. Soriano del Castillo

A mis padres,

A David,

A mi hija, Vera

RESUMEN

Las enteroparasitosis afectan a la estructura y ambiente intestinal generando sintomatología en pacientes susceptibles. Éstas podrían llegar a desencadenar, agravar o confundirse con Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC), cada vez más frecuentes en la población. En el presente estudio, se analiza la prevalencia de parásitos intestinales en 295 pacientes con TGC y/o sintomatología mediante la combinación de métodos diagnósticos. *Giardia intestinalis* fue el parásito más prevalente (61,7%), seguido de *Blastocystis* sp. (13,2%), con una prevalencia de parasitación general del 67%. El análisis molecular halló los genotipos A (96%) y B (4%) de *G. intestinalis*, y cinco subtipos de *Blastocystis*: ST1 (17,4%), ST2 (30,4%), ST3 y ST4 (21,7%) y ST6 (8,7%). Pese a ser el parásito más frecuente, la asociación entre *G. intestinalis* y sus genotipos/subgenotipos con los TGC no ha podido ser demostrada, mientras que sí lo fue para *Blastocystis* y la intolerancia/malabsorción a lactosa, y entre el ST1 y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Asimismo, se reveló una asociación significativa entre *G. intestinalis* y *Blastocystis*, y la presencia de sintomatología cíclica, fatiga crónica, pérdida de peso y dolor articular, además de urticaria en el caso de *G. intestinalis*. Por último, se identificó como factor de riesgo de adquirir *G. intestinalis*, el contacto habitual con niños/as y/o personas con discapacidad. La tasa de parasitación intestinal no diagnosticada en la población de estudio es muy elevada y se asocia con una mayor prevalencia de sintomatología, sin embargo, queda sin confirmar la asociación de un genotipo/subgenotipo/subtipo concreto con la enfermedad en el ser humano. Es necesario la realización de estudios específicos con un mayor tamaño muestral e incluyendo grupos control para avanzar en la interpretación del papel patógeno de *G. intestinalis* y *Blastocystis*.

PALABRAS CLAVE: Parásitos intestinales, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis*, caracterización molecular, trastornos gastrointestinales crónicos, sintomatología.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores **María Trelis, Juan Francisco Merino y José Miguel Soriano**, por el apoyo y las oportunidades que me habéis brindado. Ha sido un honor trabajar con vosotros.

A **María**, por ser una magnífica directora, además de una gran amiga. Gracias por enseñarme con paciencia, entender mi situación y confiar en mí, por facilitarme las cosas, ayudarme en todo y ofrecerme oportunidades a las que jamás habría podido acceder por mi cuenta. Para mí, eres una bellísima persona y un ejemplo que seguir.

A mis padres, **Carmen y Vicente**, por la paciencia, esfuerzo y apoyo que me han ofrecido durante este camino y durante toda la vida. Porque, sin vosotros, no habría podido llegar a donde estoy ahora ni disfrutar de todo lo que tengo.

A **David**, mi compañero de vida, mi amigo y mi amor. Por todo su ánimo, esfuerzo, paciencia, motivación y cariño incondicional. Por alentarme a seguir adelante y aguantarme en los momentos de desesperación. Estoy segura de que sin ti las cosas serían muy diferentes.

A mi hija, **Vera**, el amor de mi vida, porque gracias a ti esta tesis ha visto la luz.

A mi **familia**, por su apoyo, en especial a mis primas: **Cristina, Amanda, Blanca e Irene**, por animarme e interesarse, por los momentos de desconexión y de risas que siempre están presentes.

Agradezco con todo mi corazón a mis compañeras y amigas: **Carmen Doménech**, compañera de batallas desde mis comienzos en el mundo de la nutrición, gracias por escucharme, apoyarme y animarme, porque tú fuiste la que me alentó a seguir este camino. **Silvia Taroncher**, por hacerme sentir como en casa desde el inicio de este viaje, por enseñarme con paciencia y ayudarme en todo momento. **Katalina Cruz**,

por escucharme y apoyarme incluso en la distancia, por motivarme a continuar adelante y entenderme tan bien. **Tephy Tapia**, por toda la ayuda brindada cuando más la necesitaba, y por las charlas y risas de laboratorio. **Jana Caudet**, por nuestras charlas y viajes, por escucharme, ayudarme, entenderme y aconsejarme siempre. **Marta García**, por todos los momentos divertidos, alegres y locos que hemos vivido juntas, porque la experiencia en Madrid no había sido lo mismo sin ti. Mis “Nutris”: **Carolina, María, Paula, Inma, Evelyn, Elke, Cristina y Sonia**, por seguir juntas todos estos años, por compartir mis penas y mis alegrías. A todas ellas porque, en muchas ocasiones, han sido pilares fundamentales que me han guiado y ayudado a cambiar la perspectiva.

A **Marius Fuentes**, por acogerme, por tus consejos y ayuda con los idiomas y brindarme todos tus conocimientos en una etapa complicada y confusa del doctorado, ¡la estadística! A **Mónica Gozalbo**, por todo el apoyo y ayuda desinteresada durante este camino, por ser una “crack” en la microscopía y resolverme las dudas en cualquier momento. A **Sandra Sáez** por ser una gran aprendiz y ayudarme tanto en la siguiente etapa de mi vida.

A **Antonio Marcilla, Maite Galán, Alicia Galiano, Javier Roig, Christian Sáez, Gemma Muñoz, Anabel Bolado y Gaby Tapia** por el apoyo, la ayuda y los buenos momentos, tanto dentro como fuera del laboratorio.

Agradecer también a **David Carmena** la oportunidad de realizar la estancia en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, bajo su tutela y aportarme tanto conocimiento, una experiencia que jamás olvidaré. Y a **Antonio Osuna** por su generosidad, ya que sin ella no habría podido realizar parte de esta tesis doctoral.

¡GRACIAS A TODOS/AS!

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADI	Arginina deiminasa
Ag	Antígeno
AMP	Péptidos antimicrobianos
AMSE	Asociación de Médicos de Sanidad Exterior
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (por sus siglas en inglés, American Type Culture Collection)
bg	β -Giardina
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Albúmina de suero bovino
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention)
CPs	Cisteína proteasas
Ct	Ciclo umbral (por sus siglas en inglés, threshold cycle)
CU	Colitis ulcerosa
CUNAFF	Clínica Universitaria de Nutrición, Actividad Física y Fisioterapia
CXCL8	Interleuquina 8 quimioatrayente de neutrófilos
DAO	Diamino oxidasa
ddNTP	Didesoxirribonucleótidos trifosfato
DFA	Inmunofluorescencia directa (por sus siglas en inglés, Direct Fluorescent Antibody o Direct Immunofluorescence)
DLG	Dieta libre de gluten
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DS	Desviaciones estándar
E. Cr	Enfermedad de Crohn
EC	Enfermedad Celíaca
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (por sus siglas en inglés, European Centre for Disease Prevention and Control)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (por sus siglas en inglés, European Food Safety Authority)
EIA	Enzimoimmunoensayos (por sus siglas en inglés, Enzyme Immunoassays)
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EU/EEA	Unión Europea/Espacio Económico Europeo (por sus siglas en inglés, European Union/European Economic Area)
EVA	Escala Visual Analógica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FODMAPs	Oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables (por sus siglas en inglés, Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, and Polyols)
GCATBs	Giardia Catepsina B
gdh	Glutamato deshidrogenasa

GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (por sus siglas en inglés, Human Leucocytic Antigen)
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
IF	Intolerancia/malabsorción a fructosa
IFA	Inmunofluorescencia indirecta (por sus siglas en inglés, Indirect Fluorescent Antibody o Indirect Immunofluorescence)
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Intolerancia/malabsorción a lactosa
IL-6	Interleuquina 6
IL-17	Interleuquina 17
IL-17A	Interleuquina 17A
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL-23	Interleuquina 23
IL-8	Interleuquina 8
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2 (por sus siglas en inglés, Major Histocompatibility Complex)
MLG	Genotipado Multi-Locus (MLST: Multilocus Sequence Typing)
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information)
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa beta

NO	Óxido nítrico
NRPS	Policétido no ribosomal sintasa (por sus siglas en inglés, non-ribosomal polyketide synthase)
OCT	Ornitina carbamoiltransferasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Ortofenilendiamina
OR	Odds Ratio
PAR-2	Receptor activado por proteasa 2
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, Phosphate buffered saline)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFO	Piruvato ferredoxina oxidorreductasa
PKS	Policétido sintasa (por sus siglas en inglés, polyketide synthase)
PNPO	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
Rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SGNC	Sensibilidad al gluten no celíaca
SIBO	Sobrecrecimiento bacteriano (por sus siglas en inglés, Small Intestinal Bacterial Overgrowth Syndrome)
SII	Síndrome de Intestino Irritable
SII-PI	Síndrome del Intestino Irritable post-infeccioso

SIM	Sistema de Información Microbiológica
SNP	Polimorfismos de un único nucleótido (por sus siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorphism)
SSU	Subunidad pequeña ribosomal
ST	Subtipo
STH	Helmintos transmitidos por el suelo (por sus siglas en inglés, Soil-Transmitted Helminths)
TGC	Trastornos Gastrointestinales Crónicos
Th17	Vía de activación de linfocitos T helper 17
TIC	Trastornos Intestinales Crónicos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
tpi	Triosa fosfato isomerasa
TTG	Transglutaminasa tisular
UV	Ultravioleta
VSP	Proteínas variables de superficie

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía y clasificación de <i>G. intestinalis</i>	37
Tabla 2. Revisión de Heyworth y colaboradores (2016) de los genotipos de <i>Giardia intestinalis</i> y los hospedadores afectados	49
Tabla 3. Taxonomía y clasificación de <i>Blastocystis</i> sp.	62
Tabla 4. Criterios Roma IV para el diagnóstico y clasificación del Síndrome del Intestino Irritable	88
Tabla 5. Composición del tampón fosfato salino	106
Tabla 6. Patologías de interés en la población de estudio	111
Tabla 7. Reactivos y cantidades empleadas en la qPCR de <i>G. intestinalis</i>	121
Tabla 8. Secuencia completa del gen <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i>	126
Tabla 9. Cebadores específicos para el gen <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i>	127
Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR semianidada del gen <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i>	127
Tabla 11. Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>gdh</i>	128
Tabla 12. Cebadores específicos para el gen <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i>	129
Tabla 13. Mix de reacción para la PCR anidada del gen <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i>	129
Tabla 14. Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>bg</i>	130
Tabla 15. Cebadores específicos para el gen <i>SSU rRNA 18S</i> de <i>Blastocystis</i> sp.	131
Tabla 16. Mezcla de reacción para la PCR de <i>Blastocystis</i> sp.	131
Tabla 17. Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>SSU</i> de <i>Blastocystis</i>	132
Tabla 18. Secuencias de referencia obtenidas en BLAST utilizadas para el genotipado y subgenotipado de <i>G. intestinalis</i>	139
Tabla 19. Características generales de la población de estudio.....	149
Tabla 20. Patologías presentes en la población de estudio	151
Tabla 21. Desencadenantes y antecedentes de los TGC y sintomatología	154

Tabla 22. Especies parásitas más prevalentes en la población de estudio	157
Tabla 23. Prevalencias de parasitación en función del sexo	158
Tabla 24. Prevalencias de parasitación en función de la edad.....	159
Tabla 25. Métodos diagnósticos para <i>Giardia intestinalis</i>	164
Tabla 26. Métodos diagnósticos para <i>Blastocystis</i> sp.....	165
Tabla 27. Diversidad, prevalencia y características moleculares de <i>G. intestinalis</i> en la población de estudio.....	169
Tabla 28. Prevalencias de TGC y otras patologías intestinales según el estado parasitario.....	181
Tabla 29. Prevalencias de enfermedades extraintestinales según el estado parasitario.....	182
Tabla 30. Prevalencias de TGC y otras patologías gastrointestinales según la parasitación por <i>G. intestinalis</i>	183
Tabla 31. Prevalencias de enfermedades extraintestinales según la parasitación por <i>G. intestinalis</i>	185
Tabla 32. Prevalencias de TGC y otras patologías gastrointestinales según la parasitación por <i>Blastocystis</i> sp.....	187
Tabla 33. Prevalencias de enfermedades extraintestinales según la parasitación por <i>Blastocystis</i> sp.....	189
Tabla 34. Distribución de casos de TGC y otras patologías gastrointestinales en función del subtipo de <i>Blastocystis</i> sp.	191
Tabla 35. Distribución de casos de enfermedades extraintestinales en función del subtipo de <i>Blastocystis</i>	192
Tabla 36. Análisis de los factores de riesgo en función del estado parasitario	212

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> capturado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)	38
Figura 2. Cultivo in vitro de trofozoítos y quistes de <i>G. intestinalis</i>	40
Figura 3. Morfología detallada del trofozoíto de <i>G. intestinalis</i>	41
Figura 4. Adhesión de un trofozoíto de <i>Giardia</i> a las microvellosidades de la superficie de una célula intestinal Caco-2 in vitro.	41
Figura 5. Morfología detallada del quiste de <i>G. intestinalis</i>	42
Figura 6. Morfología y estructura del quiste de <i>G. intestinalis</i>	42
Figura 7. Ciclo biológico de <i>G. intestinalis</i>	44
Figura 8. Fisión binaria longitudinal del trofozoíto de <i>Giardia intestinalis</i> capturada con MEB.....	45
Figura 9. <i>G. intestinalis</i> revistiendo la superficie del epitelio intestinal.	46
Figura 10. Posible espectro clínico producido por <i>G. intestinalis</i>	52
Figura 11. Modelo complejo de la patogénesis de <i>G. intestinalis</i> y factores determinantes de la misma, dependientes del ecosistema intestinal y de la respuesta del hospedador.	54
Figura 12. Visualización de <i>Blastocystis</i> sp. en tinción de lugol	62
Figura 13. Formas morfológicas de <i>Blastocystis</i>	64
Figura 14. Ciclo de vida de <i>Blastocystis</i>	67
Figura 15. Carácter zoonótico de los subtipos de <i>Blastocystis</i> (ST) entre humanos y animales.....	72
Figura 16. Posibles interacciones entre <i>Blastocystis</i> y el estado sintomático del hospedador.....	74

Figura 17. Visión general de los efectos fisiopatológicos de <i>Blastocystis</i> en la mucosa intestinal y mecanismos demostrados in vitro e in vivo con modelos animales en relación con subtipos específicos (ST1, ST3, ST4 y ST7).....	78
Figura 18. Proceso de absorción intestinal de los monosacárido	82
Figura 19. Esquema de la intervención. Diagrama de flujo de pacientes, muestras, técnicas parasitológicas y resultados.....	108
Figura 20. Escala visual Analógica (EVA)	112
Figura 21. Escala de Bristol	113
Figura 22. Sistema de concentración y filtración por centrifugación para el diagnóstico parasitológico Midi Parasep SF.....	114
Figura 23. Procesado de muestras de heces mediante el sistema Parasep.....	115
Figura 24. Microscopio óptico Nikon ECLIPSE E100-LED	117
Figura 25. Esquema del fundamento de la PCR.....	122
Figura 26. Ciclos y condiciones del Sistema StepOnePlus para detección de <i>G. intestinalis</i> mediante qPCR.....	123
Figura 27. Síntesis de DNA en cada ciclo de amplificación de la PCR.....	124
Figura 28. Gráfica de amplificación (ΔRn vs. ciclo) mostrando la detección de <i>G. intestinalis</i> en la qPCR.....	125
Figura 29. Cubeta de electroforesis para muestras de DNA para 30 muestras de Bio-Rad® (California, USA).....	133
Figura 30. Marcador de peso molecular o escala estándar, GeneRuler 100bp DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific® (Massachusetts, USA)	134
Figura 31. Visualización de un gel de agarosa tras electroforesis mediante un transiluminador UV/Luz blanca	135
Figura 32. Fundamento de la secuenciación de Sanger y obtención de resultados	137

Figura 33. Cromatograma de las secuencias Forward (arriba) y Reverse (bajo) de una muestra de <i>Blastocystis</i> sp. obtenida mediante Chromas 2.6.6	138
Figura 34. Alineación de las secuencias anteriores en el software MEGA-X para la obtención de la secuencia consenso	138
Figura 35. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en la población de estudio.....	152
Figura 36. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en la población de estudio.....	153
Figura 37. Parásitos más prevalentes en función del sexo	158
Figura 38. Parásitos más prevalentes en función de los grupos de edad.	160
Figura 39. Porcentajes de positivos con los diferentes métodos combinados empleados para el diagnóstico de <i>G. intestinalis</i>	164
Figura 40. Porcentajes de positividad de los diferentes métodos diagnósticos de <i>Blastocystis</i> sp. por separado y combinados	166
Figura 41. Resultados obtenidos en la secuenciación de las muestras positivas de <i>G. intestinalis</i> mediante PCR convencional	168
Figura 42. Resultados obtenidos en la secuenciación de las muestras positivas de <i>Blastocystis</i> mediante PCR convencional.....	171
Figura 43. Frecuencia de los subtipos (ST) de <i>Blastocystis</i> sp.....	172
Figura 44. Diversidad y frecuencia de los ST de <i>Blastocystis</i> sp.....	173
Figura 45. Prevalencia de los ST de <i>Blastocystis</i> en función del sexo.	174
Figura 46. Diversidad y frecuencia de los ST y alelos de <i>Blastocystis</i> en función del sexo	175
Figura 47. Resultados obtenidos en la secuenciación de <i>Blastocystis</i> en función de los grupos de edad.....	176
Figura 48. Prevalencia de los ST de <i>Blastocystis</i> según el grupo de edad.....	177

Figura 49. Diversidad y frecuencia de los ST de <i>Blastocystis</i> sp. identificados en los pacientes con edades entre los 30 y 51 años.	178
Figura 50. Diversidad y frecuencia de los ST de <i>Blastocystis</i> sp. identificados en los pacientes con edades entre los 20 y 30 años.	179
Figura 51. Diversidad y frecuencia de los ST de <i>Blastocystis</i> sp. identificados en los pacientes con edades superiores a los 50 años.	179
Figura 52. Prevalencias de las intolerancias/malabsorciones a carbohidratos.	182
Figura 53. Prevalencias de las intolerancias/malabsorciones a presentes en los pacientes con <i>G. intestinalis</i> y el grupo NP.	184
Figura 54. Subgenotipos presentes en la población parasitada por el genotipo A de <i>G. intestinalis</i>	186
Figura 55. Prevalencias de las diferentes intolerancias/malabsorciones presentes en los pacientes parasitados por <i>Blastocystis</i> y en los NP.	188
Figura 56. Distribución de los ST de <i>Blastocystis</i> entre la población de estudio....	190
Figura 57. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados (grupo P) y no parasitados (grupo NP)	194
Figura 58. Prevalencia de los diferentes síntomas extraintestinales presentes en los pacientes los pacientes de los grupos P y NP	195
Figura 59. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados por <i>G. intestinalis</i> y los no parasitados (grupo NP)	197
Figura 60. Prevalencia de los diferentes síntomas extraintestinales presentes en los pacientes parasitados por <i>G. intestinalis</i> y los NP.....	198
Figura 61. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal en la población de estudio según el subgenotipo de <i>G. intestinalis</i>	201
Figura 62. Prevalencia de los síntomas extraintestinales presentes en la población de estudio según el subgenotipo de <i>G. intestinalis</i>	202

Figura 63. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados por <i>Blastocystis</i> y los NP.....	204
Figura 64. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en los pacientes parasitados por <i>Blastocystis</i> y los no parasitados (grupo NP).....	205
Figura 65. Prevalencia de la sintomatología intestinal presente en la población de estudio según el ST de <i>Blastocystis</i> sp.	207
Figura 66. Prevalencia de la sintomatología gástrica presente en la población de estudio según el ST de <i>Blastocystis</i> sp.	209
Figura 67. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en la población de estudio según el ST de <i>Blastocystis</i> sp	210

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	29
1. PARASITOSIS INTESTINALES.....	31
1.1. <i>Definición y situación actual</i>	31
1.2. <i>Giardia intestinalis</i>	37
1.3. <i>Blastocystis sp.</i>	61
2. TRASTORNOS GASTROINTESTINALES CRÓNICOS.....	81
2.1. <i>Intolerancia/malabsorción a Carbohidratos</i>	81
2.2. <i>Enfermedad Celíaca</i>	84
2.3. <i>Síndrome del Intestino Irritable</i>	86
2.4. <i>Enfermedad Inflamatoria Intestinal</i>	89
2.5. <i>Gastritis crónica</i>	92
II. OBJETIVOS	97
1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	99
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	99
III. MATERIAL Y MÉTODOS	101
1. MATERIAL.....	103
1.1. <i>Población objeto de estudio</i>	103
1.2. <i>Muestras biológicas</i>	104
2. MÉTODOS.....	107
2.1. <i>Diseño del Estudio</i>	107
2.2. <i>Herramientas utilizadas para la obtención de datos clínicos</i>	112
2.3. <i>Análisis parasitológico de muestras fecales</i>	114
2.4. <i>Análisis inmunológico de muestras de saliva</i>	140
2.5. <i>Análisis estadístico</i>	145
2.6. <i>Consideraciones éticas</i>	146

IV. RESULTADOS.....	147
1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	149
1.1. <i>Características generales</i>	149
1.2. <i>Trastornos Gastrointestinales Crónicos y patologías asociadas</i>	150
1.3. <i>Sintomatología</i>	152
1.4. <i>Desencadenantes y antecedentes de los TGC y/o sintomatología</i>	154
2. FRECUENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO DE ESPECIES	156
2.1. <i>Prevalencia de parasitación en función del sexo</i>	157
2.2. <i>Prevalencia de parasitación en función de la edad</i>	159
2.3. <i>Monoparasitismo y multiparasitismo</i>	160
3. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	163
3.1. <i>Diagnóstico de G. intestinalis</i>	163
3.2. <i>Diagnóstico de Blastocystis sp.</i>	165
4. ANÁLISIS MOLECULAR.....	167
4.1. <i>Caracterización molecular de G. intestinalis</i>	167
4.2. <i>Caracterización molecular de Blastocystis sp.</i>	171
5. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-TGC Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	180
5.1. <i>En función del estado parasitario</i>	180
5.2. <i>En función de la parasitación por G. intestinalis</i>	183
5.3. <i>En función de la parasitación por Blastocystis sp.</i>	186
6. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-SINTOMATOLOGÍA.....	193
6.1. <i>En función del estado parasitario</i>	193
6.2. <i>En función de la parasitación por G. intestinalis</i>	196
6.3. <i>En función de la parasitación por Blastocystis sp.</i>	203
7. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE PARÁSITOS INTESTINALES.....	211
V. DISCUSIÓN	213
1. FRECUENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO DE ESPECIES	215
2. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	222

3. ANÁLISIS MOLECULAR.....	227
4. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-TGC Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS.....	238
5. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-SINTOMATOLOGÍA.....	250
6. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE PARÁSITOS INTESTINALES.....	258
VI. CONCLUSIONES.....	261
1. CONCLUSIONES.....	263
2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PROPUESTAS DE FUTURO.....	266
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	267
VIII. ANEXOS.....	335
1. ANEXO 1. EJEMPLO DE INFORME DE RESULTADOS PARA EL PACIENTE.....	337
2. ANEXO 2. CUESTIONARIO DE RECOGIDA DE DATOS.....	338
3. ANEXO 3: CERTIFICADO DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN EN HUMANOS.....	340
4. ANEXO 4: CERTIFICADO DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD.....	341

I. INTRODUCCIÓN

1. PARASITOSIS INTESTINALES

1.1. Definición y situación actual

Un **parásito** es un organismo que vive sobre o dentro de otro organismo hospedador y obtiene sus alimentos de o a expensas de dicho hospedador. Las tres principales clases de parásitos que pueden causar enfermedades en el ser humano son protozoos, helmintos y artrópodos (pulgas, garrapatas, etc.) (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2016).

Las **parasitosis intestinales** son las enfermedades producidas por endoparásitos que habitan en el intestino, ya sean unicelulares como los protozoos, o pluricelulares como los helmintos (Chover et al., 2010).

Los **protozoos** son organismos unicelulares microscópicos que pueden ser de vida libre o parásita. Las enfermedades por protozoos o protozoosis, se producen al multiplicarse el parásito en el interior del hospedador por diferentes mecanismos, según la especie, y pueden desarrollar infecciones graves a partir de un único organismo. En el caso de los protozoos intestinales humanos, la vía de transmisión más común es la fecal-oral mediante el contacto directo con personas o animales infectados o por el consumo de alimentos o agua contaminados.

Por otro lado, los **helmintos** (vermes) son organismos pluricelulares que generalmente presentan una forma alargada, un cuerpo blando, carecen de esqueleto, y difieren de tamaño y forma según la especie, siendo visibles a simple vista en su etapa adulta. Estos también pueden ser de vida libre o parásitos en la naturaleza. Se clasifican en tres grupos: nematodos, trematodos y cestodos. Las

Introducción

helmintiasis intestinales humanas se transmiten por diferentes vías: suelos (geohelminths), agua o alimentos contaminados o por el consumo de alimentos concretos con fases larvianas (CDC, 2016).

Las parasitosis intestinales suponen un gran problema de salud pública a nivel global con elevadas tasas de morbi-mortalidad debido a su elevada prevalencia, a su amplia distribución a lo largo del mundo y a su capacidad de causar enfermedad afectando, en mayor medida, a la población de países en vías de desarrollo, tropicales, subtropicales y de climas templados, y, en menor medida, a los países desarrollados (Kirk et al., 2015; CDC, 2016; Rojo-Marcos & Cuadros-González, 2016; Vos et al., 2017; Pisarski, 2019). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2017 aproximadamente un 25% de la población mundial (1.500 millones de personas) se encontraban en riesgo de sufrir parasitosis intestinales. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2018) afirma que en los países europeos se confirman al año más de 1.000 casos de parasitosis de origen alimentario o transmitidas por alimentos y/o aguas contaminados.

Los parásitos intestinales pueden infectar a población de cualquier grupo de edad, pero afectan en mayor medida a los más vulnerables, como la población más desfavorecida, con bajos recursos socioeconómicos y condiciones higiénico-sanitarias deficientes, junto con la población infantil, produciendo una sintomatología intestinal aguda, dando lugar a malabsorción de nutrientes y desnutrición, y repercutiendo en el desarrollo físico y cognitivo de los niños (Solano et al., 2008). Otros grupos de población que pueden verse afectados son los viajeros y personas inmunocomprometidas (Rojo-Marcos & Cuadros-González, 2016; Swathirajan et al., 2017; Jeske et al., 2018; Caner et al., 2019; Connor et al., 2019; Esteghamati et al., 2019; Rodríguez-Pérez et al., 2019). Asimismo, las parasitosis no

diagnosticadas y no tratadas pueden perdurar en el tiempo y cronificar apareciendo, junto con la sintomatología intestinal, una afectación física y psico-social del paciente (Bartelt & Sartor, 2015).

Los datos reales de prevalencia de parasitosis intestinales en humanos a nivel global son difíciles de conocer debido a varios factores: a) el diagnóstico de la mayoría de enfermedades causadas por especies parásitas no es de notificación obligatoria en muchos países; b) la mayoría de las infecciones producidas por protozoos son asintomáticas en un gran grupo de población, por lo que no serán diagnosticadas, ni notificadas; c) existen multitud de casos con sintomatología leve e infección autolimitante que no acuden a la sanidad pública y, por tanto, no se diagnostican ni contabilizan; d) la limitación de los métodos diagnósticos rutinarios en sanidad pública con una baja sensibilidad da lugar a falsos negativos (Fletcher et al., 2012; McHardy et al., 2014; Plutzer et al., 2016; Rojo-Marcos & Cuadros-González, 2016; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud [FAO/OMS], 2018; Reh et al., 2019).

Las especies de protozoos con mayor importancia en salud pública, tanto en los países desfavorecidos como en los desarrollados, son *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica*, considerados los principales causantes enfermedad gastrointestinal y diarrea aguda de origen parasitario, siendo responsables de tasas significativas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo *Cryptosporidium* spp. la segunda causa de mortalidad por diarrea en menores de 5 años en los países con rentas más bajas (Chover et al., 2010; Fletcher et al., 2012; Plutzer et al., 2016; Rojo-Marcos & Cuadros-González, 2016; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Efstratiou et al., 2017; Kotloff, 2017; Ahmed et al., 2018; Pisarski, 2019; Reh et al., 2019; Dacal et al., 2020). Más allá de los cuadros diarreicos, las

Introducción

enfermedades causadas por estos protozoos producen un deterioro de la capacidad de absorción intestinal, llegando a causar síndromes de malabsorción y desnutrición en los casos más graves, pudiendo afectar a la función cognitiva y al desarrollo de los niños, y a la capacidad laboral y productiva de los adultos (Flecha et al., 2015; Kotloff, 2017). Por estos motivos, tanto *G. intestinalis* como *Cryptosporidium* spp. fueron incluidos en 2004 en la Iniciativa de las Enfermedades Desatendidas de la OMS (Savioli et al., 2006) y, junto con *E. histolytica*, en la clasificación de los parásitos transmitidos por agua y alimentos con mayor importancia en salud pública a escala mundial según los expertos de la FAO/OMS en 2018.

Las enfermedades causadas por estos 3 protozoos son notificables en los países de la Unión Europea y del Espacio Económico Europeo (EU/EEA, por sus siglas en inglés), siendo la criptosporidiosis y giardiosis de declaración obligatoria. En 2017, se notificaron 19.437 casos confirmados de giardiosis y 11.418 de criptosporidiosis, de los cuales 2.953 y 554 se notificaron en España, respectivamente. La tasa más elevada de ambos parásitos se registró en el grupo de edad entre 0 y 4 años (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2019a; ECDC, 2019b). En el mismo año la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE, 2017) publicó el informe anual del Sistema de Información Microbiológica (SIM) donde se detallan los datos relativos a las notificaciones de las diferentes patologías infecciosas por laboratorios españoles en el año 2016, con la limitación de que estima una cobertura de solamente el 30% de la población. En este caso, se notificaron 1067 casos confirmados de giardiosis y 180 casos de criptosporidiosis, disminuyendo respecto a los 582 casos notificados en el año 2015. En ambos casos hubo una mayor incidencia en niños con edades comprendidas entre 1 y 9 años. En el caso de *E. histolytica* se notificaron 16 casos confirmados sin destacar una

prevalencia mayor en grupos de edad específicos, manifestando la menor incidencia de este parásito en nuestro país (RENAVE, 2017).

Otros parásitos unicelulares frecuentes en España son *Blastocystis* sp. y *Dientamoeba fragilis* (Fletcher et al., 2012), cuya identificación no es de notificación obligatoria debido a la controversia sobre su posible patogenicidad o comensalismo (Stensvold & van der Giezen, 2018; Wong et al., 2018; de Boer et al., 2020; Stensvold et al., 2020). En el caso de *Blastocystis*, se ha asociado a sujetos asintomáticos y con una microbiota sana y diversa (Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramírez et al., 2018; Mardani et al., 2019; Reh et al., 2019; Tito et al., 2019; de Boer et al., 2020), así como a pacientes con Trastornos Intestinales Crónicos (TIC) como el Síndrome de Intestino Irritable (SII) (Yakoob et al., 2010a; Nourrisson et al., 2014; Cifre et al., 2018) o situaciones de alteración de la microbiota intestinal o disbiosis (Nourrisson et al., 2014; Yason et al., 2019), e incluso a pacientes que presentan sintomatología extraintestinal como urticarias (Casero et al., 2015; Aydin et al., 2019; Bahrami et al., 2019).

En el caso de las helmintiasis intestinales humanas, según la OMS (2004) afectan a un mínimo de 2.000 millones de personas a nivel mundial (24% aproximadamente), lo que supone una amenaza para las poblaciones desfavorecidas con pobres sistemas sanitarios y problemas de desnutrición. Las helmintiasis graves no tratadas son capaces de producir problemas importantes, sobre todo en los más pequeños, que afectan tanto al desarrollo intelectual como físico y que dejan secuelas de por vida (OMS, 2004).

Entre las helmintiasis intestinales humanas destacan las producidas por los geohelminchos o helmintos transmitidos por suelo (Soil-Transmitted Helminths, STH) por ser las más frecuentes en humanos a nivel global. Más de un cuarto de la

Introducción

población mundial se encuentra en riesgo de infección por estas nematodosis producidas por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis* (Hotez et al., 2009; Jourdan et al., 2018; Dacal et al., 2020; OMS, 2020). La infección masiva por estos parásitos puede producir sintomatología intestinal, como diarrea y dolor abdominal, desnutrición por malabsorción de nutrientes, anemia y obstrucción intestinal y biliar (Ehiaghe et al., 2013; Oliveira et al., 2015; Galgamuwa et al., 2018; Dacal et al., 2020; OMS, 2020).

En relación a las infecciones por helmintos transmitidos por alimentos (carnes o pescados crudos o poco procesados), las más comunes son las producidas por *Anisakis* spp., *Trichinella* spp., *Taenia solium* y *Taenia saginata* (Robertson et al., 2018; Dacal et al., 2020) y suelen ser origen de sintomatología intestinal, como diarrea, dolor abdominal y vómitos, y/o extraintestinal, como: a) reacciones alérgicas a las proteínas del parásito como en el caso de *Anisakis* que provoca desde urticarias o angioedema, hasta shock anafiláctico (Aibinu et al., 2019); b) fiebres, urticarias/edemas, mialgia y debilidad muscular en el caso de *Trichinella*, llegando a producir miocarditis, meningoencefalitis, neumonía o fallo respiratorio (Gottstein et al., 2009; Wilson et al., 2015; Rostami et al., 2017); c) cisticercosis o neurocisticercosis junto con ataques epilépticos en el caso de *T. solium* (Debacq et al., 2017; Herrador et al., 2020). En 2017 en la EU/EEA se notificaron 168 casos confirmados de triquinosis, 5 de los cuales fueron confirmados en España, afectando en mayor medida a hombres de edades comprendidas entre 25 y 44 años (ECDC, 2019c).

Otro helminto muy común a nivel mundial que puede ser transmitido de persona a persona, o bien contaminando alimentos, es *Enterobius vermicularis*, que afecta

principalmente a niños y a su entorno familiar. La enterobiosis suele ser asintomática, pero puede producir prurito anal y vulvovaginitis en niñas (Bundy et al., 2020), y, en casos especialmente complicados, puede jugar un papel en la apendicitis aguda (Akkapulu & Abdullazade, 2015).

1.2. *Giardia intestinalis*

1.2.1. Descripción

Giardia intestinalis (también denominada *Giardia duodenalis* o *Giardia lamblia*) es un microorganismo unicelular flagelado (Figura 1) perteneciente al dominio eucariota formando parte del Reino Protista y del Orden Diplomonadida (Tabla 1).

REINO	Protista, Protozoa
SUBREINO	Excavata
FILO	Metamonada
CLASE	Fornicata
ORDEN	Diplomonadida
FAMILIA	Hexamitidae
SUBFAMILIA	Giardiinae
GENERO	<i>Giardia</i>
ESPECIE	<i>G. intestinalis</i> , <i>G. duodenalis</i> o <i>G. lamblia</i>

Giardia es un protozoo que coloniza ambientes anaerobios, concretamente el intestino delgado proximal (duodeno y yeyuno), de especies de mamíferos vertebrados entre las que se incluye el ser humano (Madigan et al., 2009).



Figura 1. Trofozoíto de *G. intestinalis* capturado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Autor: Janice Haney Carr. Fuente: CDC, ID# 8698. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=8698>.

Giardia intestinalis fue descrita inicialmente en 1681 por el neerlandés Anton van Leeuwenhoek, que observó su presencia tras examinar una muestra de su materia fecal con un microscopio de fabricación propia. En años posteriores, otros investigadores la describieron proponiendo los siguientes nombres: *Cercomonas intestinalis* en 1859 por el investigador checo Lambl; *Megastoma entérica* en 1881 por Grassi; *Giardia* para denominar al género de estos protozoos flagelados en 1882 por Kunster; *Lamblia intestinalis* en 1888 por Blanchard en honor a Lambl; *Giardia duodenalis* en 1902 por Stiles; *Giardia lamblia* en 1915 y *Giardia entérica* en 1920 por Kofoid y Christiansen. Sin embargo, la denominación binomial *Giardia lamblia* propuesta por Stiles en 1920 en honor a los científicos Giard y Lamb fue la aceptada por la comunidad científica. Posteriormente, también fueron aceptadas las denominaciones *G. duodenalis* e *G. intestinalis* como sinónimos debido a la localización del parásito (Adam, 2001).

Como ya se ha comentado, se trata de un parásito microaerófilo, es decir, es capaz de sobrevivir en hábitats con bajas concentraciones de oxígeno como el intestino delgado, pero elevadas concentraciones de este gas pueden comprometer su

supervivencia, por este motivo, presenta un metabolismo que dispone de diferentes vías enzimáticas para su desintoxicación (Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Lagunas-Rangel & Bermúdez-Cruz, 2019). *Giardia* carece de orgánulos como mitocondrias o aparato Golgi (Lagunas-Rangel & Bermúdez-Cruz, 2019) y utiliza principalmente las vías de la glucólisis, mediante fermentación y arginina dihidrolasa, para la obtención de energía a partir de los nutrientes presentes en el contenido intestinal (glucosa, bilis, etc.) que introduce mediante fagocitosis y pinocitosis a través del disco ventral (Einarsson et al., 2016).

Dentro del género *Giardia* la única especie que produce infección en el ser humano es *G. intestinalis*, ya sea de forma sintomática o asintomática. Sin embargo, es frecuente encontrar aislados de esta especie en animales domésticos (perros, gatos, pájaros, ovejas, cabras, caballos, roedores, etc.) o salvajes, considerando el potencial zoonótico del parásito y a estos animales que actuarían como reservorios para el ser humano (Ryan & Cacciò, 2013; Adell-Aledón et al., 2018; Gil et al., 2018; Sánchez-Thevenet et al., 2019).

Actualmente existen 8 especies del género que infectan a diferentes especies animales y presentan diferencias morfológicas: *G. intestinalis* (humanos), *G. muris* y *G. microti* (roedores), *G. psittaci* y *G. ardeae* (aves), *G. agilis* (anfibios), *G. cricetarum* (hámsteres) y *G. peramelis* (marsupiales) (Heyworth, 2016; Cacciò et al., 2018; Ryan et al., 2019; Thompson & Ash, 2019).

1.2.2. Morfología

Giardia intestinalis presenta dos estadios o formas biológicas: el “trofozoíto” o forma vegetativa, activa y móvil, y el “quiste” o forma de resistencia e infectante (Figura 2).

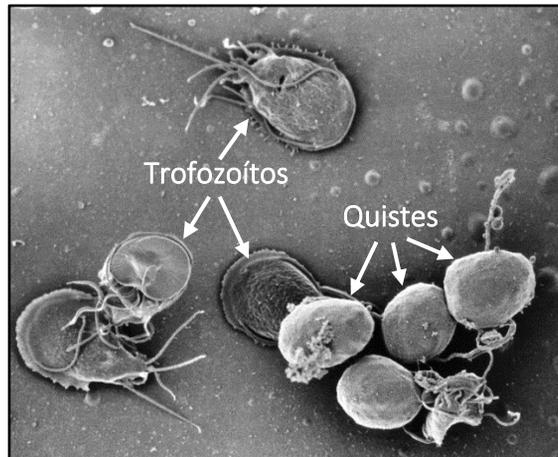


Figura 2. Cultivo *in vitro* de trofozoítos y quistes de *G. intestinalis*. Imagen realizada mediante MEB.

Autor: Dr. Stan Erlandsen. Fuente: CDC, ID# 11636. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11636>.

- **Trofozoítos:** Estos son piriformes (Figura 3), de 10 a 20 μm de diámetro con un rango habitual de 12 a 15 μm , y de simetría bilateral con dos núcleos que apenas son visibles en preparaciones en fresco o teñidas con lugol, sin embargo, pueden visualizarse mediante tinciones que desvelan su morfología ovalada con cariosomas centrales y sin cromatina periférica, y su disposición a cada lado de la línea media o axostilo, estructura que cumple la función de esqueleto. Bajo los núcleos se pueden observar los dos cuerpos medios, estructuras curvas de forma cilíndrica que se disponen transversalmente en el citoplasma (Figura 3) (Ash & Orihel, 2010).

En la parte anterior del cuerpo se encuentra la superficie ventral ocupada por una concavidad denominada “disco ventral o succionario” (Figura 3), estructura que le permite la adhesión al epitelio intestinal gracias a la acción de las proteínas contráctiles α -actina, miosina y tropomiosina y que además emplea para alimentarse (Figura 4) (Ash & Orihel, 2010).

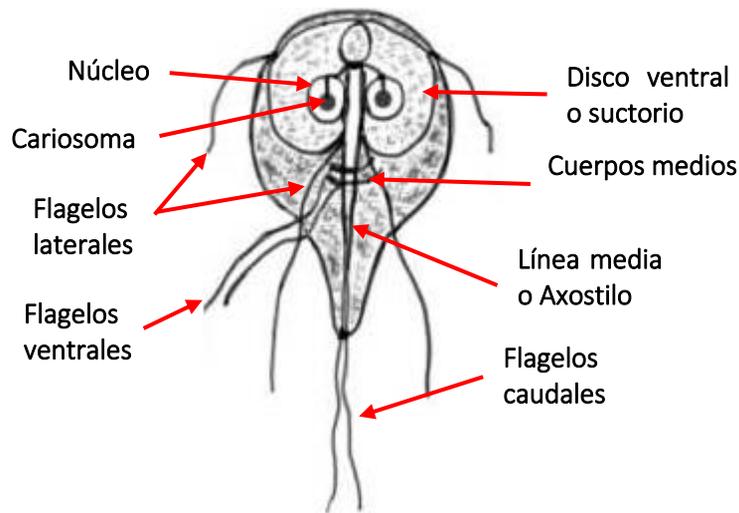


Figura 3. Morfología detallada del trofozoíto de *G. intestinalis*.

Autores: Alexander J. da Silva y Melanie Moser. Fuente: adaptado de CDC, ID# 3394. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3394>.

Giardia presenta 8 flagelos: 4 laterales, 2 ventrales y 2 caudales (Figura 3). Cada flagelo se origina en un cinetosoma y permiten el movimiento del parásito por desplazamiento o rotación u ondulante, asemejándose a una hoja cuando cae, pudiendo ser visible en una preparación en fresco (Ash & Orihel, 2010).

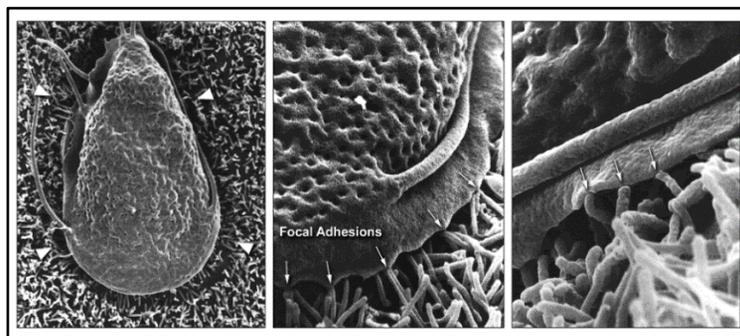


Figura 4. Adhesión de un trofozoíto de *Giardia* a las microvellosidades de la superficie de una célula intestinal Caco-2 *in vitro*.

Autor: Dr. Stan Erlandsen. Fuente: CDC, ID# 11629. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11629>.

Introducción

- **Quistes:** Los quistes o formas de resistencia del parásito son ovales o elípticos con un tamaño entre 8 y 19 μm y un rango habitual de 11 a 14 μm .

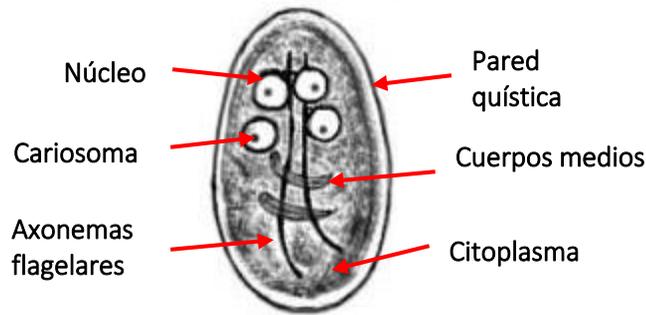


Figura 5. Morfología detallada del quiste de *G. intestinalis*.

Autores: Alexander J. da Silva y Melanie Moser. Fuente: adaptado de CDC, ID# 3394. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3394>.

Los quistes maduros presentan en su citoplasma cuatro núcleos, mientras que los inmaduros o prequistes solamente presentan dos, que suelen ser visibles junto con las fibrillas intracitoplasmáticas o axonemas flagelares y los cuerpos medios en preparaciones en fresco o teñidas con lugol (Figuras 5 y 6).

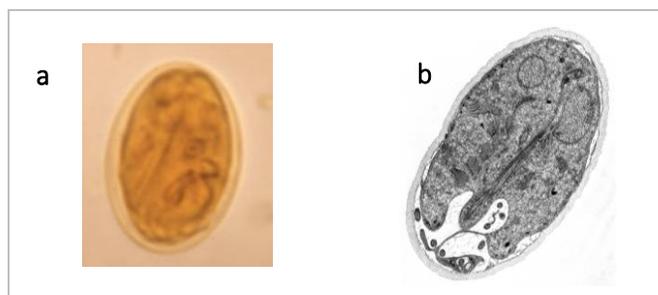


Figura 6. Morfología y estructura del quiste de *G. intestinalis*. a) Tinción de lugol. Autor: Mae Melvin. Fuente: CDC, ID# 3742. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3742>; b) MEB. Autor: Stan Erlandsen y Dennis Feely. Fuente: CDC, ID# 11625. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11625>.

En ocasiones, el citoplasma se retrae de la pared, sobre todo en muestras fijadas con formalina y se aprecia una doble membrana característica (Ash & Orihel, 2010).

1.2.3. Ciclo biológico

Giardia intestinalis presenta un ciclo biológico monoxeno directo que consta de los dos estadios evolutivos descritos en el apartado anterior: trofozoíto y quiste. Ambos pueden estar presentes en heces tanto de humanos como de animales infectados (Figura 7). La transmisión del parásito es fecal-oral y se produce principalmente por contacto directo con personas o animales infectados, o de forma indirecta mediante el consumo de aguas y/o alimentos frescos, como frutas y verduras crudas, contaminados con quistes infectantes (Figura 7) (Ryan et al., 2019).

La infección se produce tras la ingesta de los quistes maduros viables (Figura 7) que al llegar al intestino delgado proximal, y gracias al estímulo producido por el pH ácido del estómago y la presencia de bilis y tripsina, dan lugar a la exquistación, proceso en el que la pared del quiste se disuelve liberando un trofozoíto tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoítos hijos binucleados mediante el proceso de reproducción asexual denominado fisión binaria longitudinal (Figura 7 y Figura 8).

Giardiasis

(*Giardia intestinalis*)

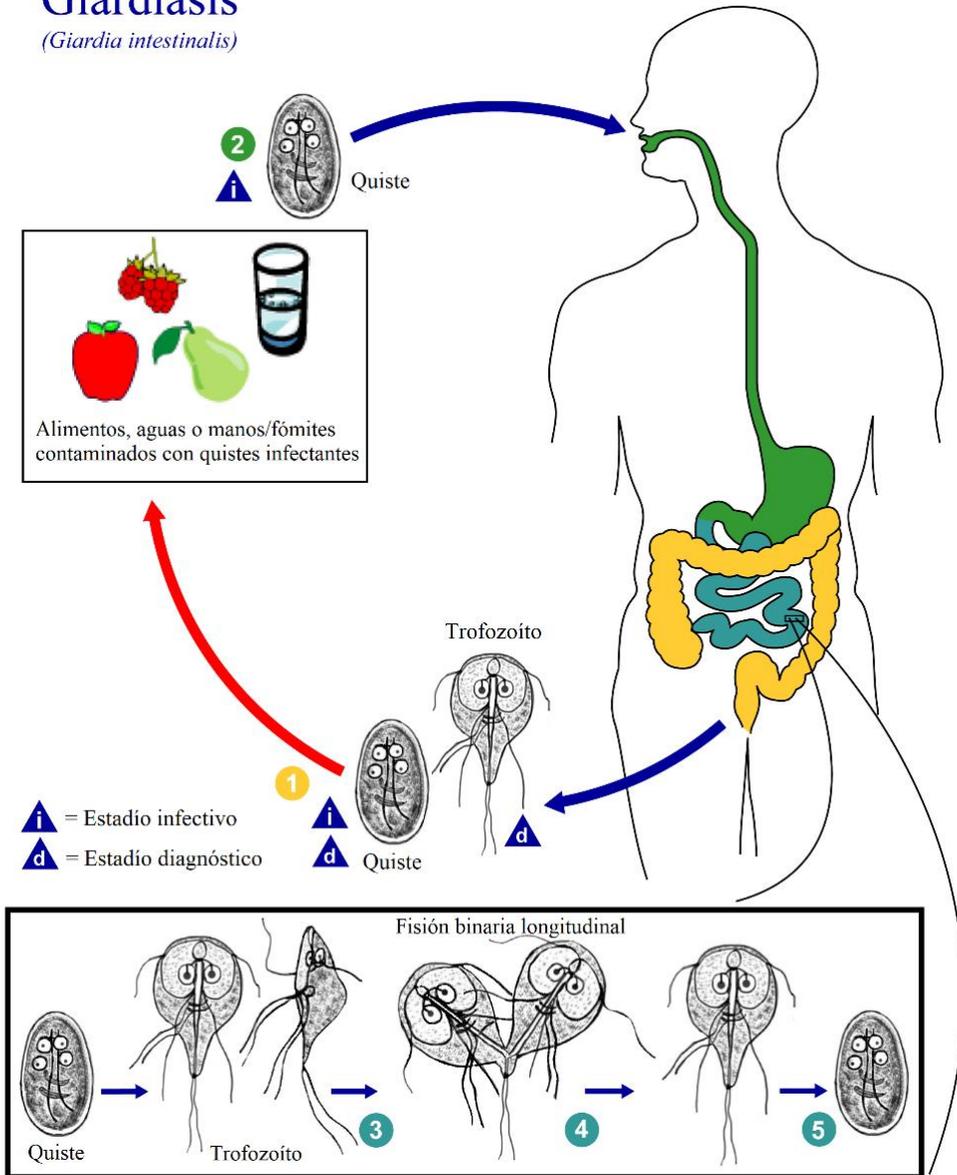


Figura 7. Ciclo biológico de *G. intestinalis*.

Autores: Alexander J. da Silva y Melanie Moser. Fuente: adaptado de CDC, ID# 3394. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3394>.

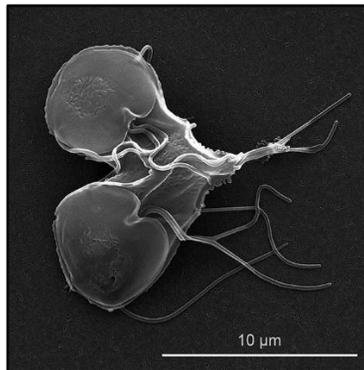


Figura 8. Fisión binaria longitudinal del trofozoíto de *Giardia intestinalis* capturada con MEB.

Autor: Dr. Renata Rosito Tonelli. Fuente:
<https://www.microimmunounifesp.com.br/en/giardia-lambliia/>

Los trofozoítos hijos colonizan principalmente duodeno o yeyuno debido a la disponibilidad de nutrientes (rara vez se encuentran en íleon, colon, vesícula o vías biliares), donde se adhieren a la superficie apical de los enterocitos mediante el disco ventral con ayuda de los flagelos (Figura 7 y 9) y se nutren y proliferan hasta que se liberan y transitan hacia el colon.

El parásito al detectar cambios en el medio externo conforme transita por el intestino delgado comienza el proceso de enquistado o deshidratación en el que el trofozoíto forma una capa glicoproteíca resistente a su alrededor transformándolo en un quiste antes de ser expulsado con las heces. Esta forma le permitirá sobrevivir en el medio externo durante varias semanas y le facilitará la transmisión a otro hospedador (Figura 7).

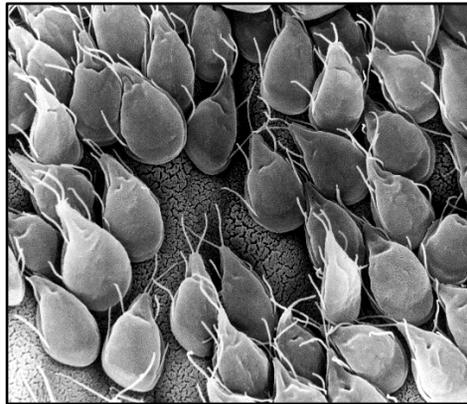


Figura 9. *G. intestinalis* revistiendo la superficie del epitelio intestinal.

Autor: Dr. Stan Erlandsen. Fuente: CDC, ID# 11632. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11632>

Los trofozoítos que no enquisten y sean expulsados en la materia fecal no serán capaces de sobrevivir y morirán en un corto periodo de tiempo, siendo incapaces de infectar a nuevos hospedadores (Einarsson et al., 2016; CDC, 2017; Vivancos et al., 2018; Lagunas-Rangel & Bermúdez-Cruz, 2019).

1.2.4. Epidemiología

Como se ha mencionado anteriormente, la giardiosis es considerada una de las infecciones gastrointestinales de origen parasitario más comunes a nivel mundial, estimándose que cada año 280 millones de personas se ven afectadas por esta enfermedad (Lane & Lloyd, 2002; Wang et al., 2019). Su prevalencia supera el 30% en los países empobrecidos, presentando una elevada morbi-mortalidad en las regiones más pobres, mientras que los valores oscilan entre el 2 y el 7% en los países desarrollados, donde se considera una enfermedad reemergente por a su implicación cada vez mayor en las patologías diarreicas que se presentan en diferentes ámbitos como guarderías y viveros debido a la falta de higiene y a la

contaminación de las aguas (Chover et al., 2010; Fletcher et al., 2012; de Lucio et al., 2016; Efstratiou et al., 2017; Vivancos et al., 2019). En la EU/EEA, la infección por *G. intestinalis* se considera la enfermedad parasitaria transmitida por alimentos y aguas más prevalente, aumentando los casos notificados cada año (ECDC, 2019b).

La giardiosis, por lo tanto, puede desarrollarse de forma endémica, afectando sobre todo a la población infantil de los países con recursos limitados, o de forma epidémica, afectando a las personas que viajan a países endémicos, estimándose que un 2-3% de las diarreas del viajero son producidas por *G. intestinalis* (Asociación de Médicos de Sanidad Exterior, 2012) y generando brotes en comunidades específicas de áreas no endémicas. Desde los años 60, han acontecido múltiples brotes de giardiosis relacionados con la contaminación de alimentos frescos o suministros de agua con materia fecal o aguas negras en ciudades de Estados Unidos, Japón, Rusia, Canadá, Noruega, etc. (Heyworth et al., 2016; Ryan et al., 2019).

Según la literatura científica la infección por *G. intestinalis* no muestra un patrón estacional claro, sin embargo, en el informe epidemiológico anual la ECDC (2019b) muestra un aumento de casos en los meses de agosto a octubre en la EU/EEA entre 2013 y 2017, sugiriendo una mayor transmisión de la enfermedad en las épocas más calurosas.

Por estos motivos y debido a que la infección por este protozoo se encuentra infradiagnosticada con multitud de casos asintomáticos, a su elevada tasa de transmisión, a su capacidad de originar brotes, y a la alta resistencia a los tratamientos farmacológicos disponibles, esta enfermedad es considerada un problema de salud pública con elevadas consecuencias sanitarias y socioeconómicas a nivel global (ECDC, 2019b).

1.2.5. Genotipos y subgenotipos de *G. intestinalis*

Giardia intestinalis es un complejo multiespecie con 8 genotipos descritos mediante caracterización genética (A-H) y que infectan a multitud de especies (Tabla 2). Los genotipos A y B son los responsables de la mayor parte de casos en humanos, sin embargo, también se han identificado de forma esporádica los genotipos C, D, E y F que suelen infectar a rangos muy estrechos de especies y presentan una elevada especificidad con el hospedador (Tabla 2) (Feng & Xiao, 2011; Ryan & Cacciò, 2013; Ryan et al., 2019; Wang et al., 2019).

A nivel mundial las prevalencias de infección que encontramos por los diferentes genotipos son más elevadas para el genotipo B (~58%) que para el A (~37%) (Ryan & Cacciò, 2013). Ambos presentan una elevada heterogeneidad genética y se han descrito diferentes subgenotipos dentro cada uno, identificando con mayor frecuencia en humanos los subgenotipos AI, AII, BIII y BIV (Feng & Xiao, 2011; Cacciò et al., 2018). Además, es común la identificación de infecciones mixtas donde coexisten diferentes genotipos y/o subgenotipos de *G. intestinalis* en un mismo hospedador, encontrando mayores prevalencias en los países en vías de desarrollo (5,2%) que en los países desarrollados (3,2%) (Ryan & Cacciò, 2013).

La diferenciación inter- e intragenotípicas que ha permitido clasificar a *G. intestinalis* en sus diferentes genotipos y subgenotipos se realiza mediante análisis molecular de fragmentos de marcadores específicos del parásito basado en el genotipado multilocus (MLG) y el análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) de genes específicos. Los principales marcadores genéticos utilizados para la caracterización del parásito en la literatura científica son los genes que codifican para las enzimas glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*), y

para la proteína estructural exclusiva del parásito, beta-giardina (*bg*) (Cacciò et al., 2008; Cacciò et al., 2018; Dacal et al., 2020).

Tabla 2. Revisión de Heyworth y colaboradores (2016) de los genotipos de *G. intestinalis* y los hospedadores afectados

GENOTIPO	HOSPEDADOR
A	Humano, perro, gato, ganado, alpaca, ciervo, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, ovejas, cabra, buey almizclero, primates no humanos, cetáceos, foca, león marino australiano, alce, reno, pollo, gaviota.
B	Humano, ganado, perro, gacela, ciervo, caballo, castor, buey almizclero, chinchilla, hurón, conejo, jutía conga, marsupiales, conejillo de indias, pollo, león marino australiano, avestruz, delfín, marsopa, gaviota.
C	Perro, otros cánidos, canguro, ganado, cerdo, cetáceo(s).
D	Perro, zorro, otros cánidos, chinchilla, canguro, ganado, cetáceo(s).
E	Bovino, ovino, cerdo, alpaca, cabra, caballo, yak, zorro, ciervo, gato.
F	Gato, cetáceo(s), cerdo.
G	Rata, ratón.
H	Foca gris, gaviota.

Debido a que existen multitud de casos asintomáticos de infección por *G. intestinalis*, ha surgido la idea de una posible relación entre el genotipo del parásito y la patogenicidad y sintomatología asociada, aunque todavía no se ha encontrado una asociación clara y la literatura científica revela resultados contradictorios. El estudio realizado por Muadica y colaboradores (2020) en niños asintomáticos de Leganés (Madrid), observó en pacientes asintomáticos una mayor prevalencia del genotipo B, mientras que Wang y colaboradores (2019) encontraron una mayor prevalencia del genotipo A. En el caso de pacientes que presentaban sintomatología intestinal, Wang y colaboradores (2019) mostraron una mayor incidencia del genotipo B, mientras que Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017) observaron una mayor

prevalencia del genotipo A (subgenotipo All), seguido del genotipo B (subgenotipos BIV y BIII).

Los subgenotipos AI y All se han identificado tanto en humanos como en animales, el All predomina en humanos, mientras que el AI se ha descrito en mayor frecuencia en mascotas, ganado y otros animales. Sin embargo, los subgenotipos del grupo B predominan en humanos y primates no humanos, encontrándose en menor medida en otros mamíferos (Feng & Xiao, 2011; Ryan & Cacciò, 2013). Por lo tanto, la transmisión de los genotipos A y B se considera que puede realizarse de forma zoonótica. Existen estudios que han identificado genotipos específicos del parásito en aislados de humanos y animales de zonas concretas, sugiriendo la transmisión humano-animal y/o viceversa que perpetuaría la supervivencia del parásito (Feng & Xiao, 2011; Heyworth, 2016; Wang et al., 2019).

1.2.6. Patogenicidad

La infección por este parásito extracelular puede ser asintomática o causar giardiosis, enfermedad gastrointestinal aguda con un espectro de manifestaciones clínicas muy variables, aunque suele estar caracterizada por producir diarrea explosiva de olor desagradable, esteatorrea, dolor y distensión abdominal, flatulencias, náuseas, vómitos, malabsorción, pérdida de peso y malestar general (Vivancos et al, 2018). La giardiosis en niños se desencadena de forma aguda causando sintomatología como diarrea y malabsorción de nutrientes pudiendo ocasionar anemia, deficiencia de vitamina B12, vitaminas liposolubles y minerales como el zinc, retraso en el crecimiento y/o afectación cognitiva si no se realiza un diagnóstico y tratamiento adecuado (Feng & Xiao, 2011; Flecha et al., 2015; Vivancos et al., 2018).

En la mayoría de casos la infección suele ser autolimitante en un periodo de 2 a 4 semanas, sin embargo, un 30-50% de los casos pueden cronificar presentando brotes diarreicos, malnutrición, disminución del peso significativo y/o desencadenando patologías digestivas como malabsorción de hidratos de carbono (fructosa, lactosa, etc.) o Síndrome de Intestino Irritable post-infeccioso, y/o patologías extradigestivas, como alergias alimentarias, urticarias, artritis, fatiga crónica o deterioro cognitivo (Asociación de Médicos de Sanidad Exterior [AMSE], 2012; Halliez & Buret, 2013; Hanevik et al., 2014; Bartelt & Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016; Trelis et al., 2019). Estas manifestaciones extraintestinales no se producen por la acción directa del parásito, si no por los diferentes mecanismos inmunopatológicos que se desencadenan tras la infección y que pueden persistir tras el diagnóstico y tratamiento (Bartelt & Sartor, 2015; Vivancos et al., 2018).

Actualmente, todavía existe incertidumbre respecto a los factores que modulan la gravedad de la giardiosis, lo que ha llevado a la comunidad científica a hipotetizar sobre las posibles variables que podrían intervenir, como la virulencia y genotipo/subgenotipo del parásito, el estado de desarrollo de la persona, el estado nutricional e inmunológico, la composición de la microbiota intestinal, la coinfección con otros patógenos, etc. (Figura 10) (Feng & Xiao, 2011; Bartelt & Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016). Según Bartelt & Sartor (2015) pequeños cambios en estas variables podrían influir en la manifestación de la enfermedad, afectando a la estructura intestinal originando cambios histológicos que van desde una enteropatía, con acortamiento severo de las vellosidades, afectación de la capacidad de absorción de nutrientes e infiltrado inflamatorio crónico capaces de originar secuelas crónicas, hasta una histología normal debido a un efecto protector de la estructura vellositaria que ejerce *G. intestinalis* frente a diarreas agudas ocasionadas

por otros patógenos inflamatorios (Figura 10) (Bartelt & Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016).

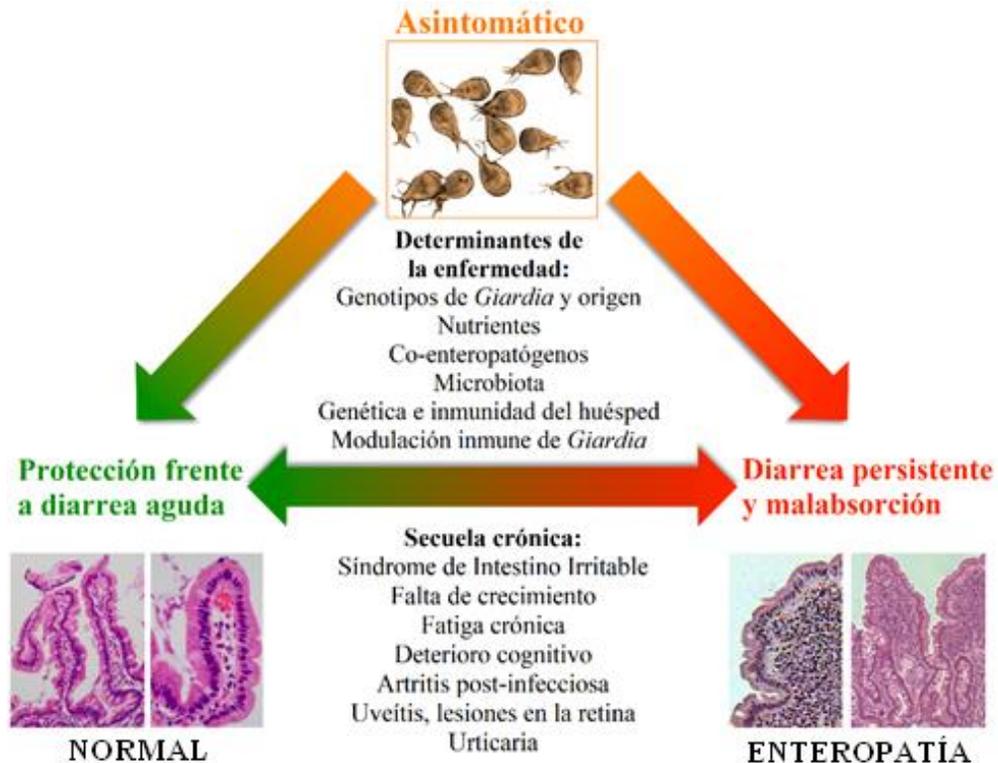


Figura 10. Posible espectro clínico producido por *G. intestinalis*.

Fuente: adaptado de Bartelt & Sartor, 2015.

Durante la giardiasis, el daño al epitelio intestinal se produce debido a la fuerte adhesión del parásito a las microvellosidades, a la respuesta inmunitaria del hospedador y a los productos de excreción/secreción del parásito (moléculas sencillas y vesículas extracelulares), implicadas en la supervivencia del parásito y, posiblemente, en la virulencia (Allain et al., 2017; Ma'ayeh et al., 2017; Cascais-Figueiredo et al., 2019). Debido a estos sucesos, se origina una alteración de la barrera epitelial y de la microbiota comensal, la destrucción de la capa mucosa

intestinal, la alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (depleción de arginina, etc.), el acortamiento de las microvellosidades con la consecuente deficiencia de disacaridasas (lactasa, sacarasa, maltasa, etc.) y transportadores, el aumento de la permeabilidad intestinal por afectación de las uniones estrechas e, incluso, la inducción de la apoptosis celular (Allain et al., 2017; Vivancos et al., 2018; Cascais-Figueiredo et al., 2019; Faria et al., 2020; Manko-Prykhoda et al., 2020).

En la Figura 11 se puede observar el modelo propuesto por Bartelt y Sartor (2015), que explicaría las interacciones entre *G. intestinalis* y el ambiente intestinal para asegurar su supervivencia. Para la defensa frente al parásito se produce la activación de la respuesta inmunológica mediante la activación de las células T CD4+, las células B sintetizadoras de anticuerpos y las células T CD8+ citolíticas, además de producir la liberación de moléculas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) (Bartelt y Sartor, 2015; Singer et al., 2019; Faria et al., 2020). Además, se produce la inducción de la interleuquina 17A (IL-17A) proinflamatoria a nivel intestinal, citoquina esencial para la liberación de la inmunoglobulina A secretora (IgAs) presente en las mucosas, para la producción de péptidos antimicrobianos (AMP) y para la regulación de la activación del complemento, facilitando el aclaramiento del parásito (Singer et al., 2019; Faria et al., 2020).

Sin embargo, una respuesta inmunitaria prolongada puede dar lugar a una cronificación de la inflamación perpetuando el daño al epitelio intestinal y el desequilibrio microbiano asociado, provocando secuelas intestinales y extraintestinales prolongadas, incluyendo el deterioro cognitivo y la afectación del crecimiento o patologías como el Síndrome del Intestino Irritable (Bartelt y Sartor, 2015).

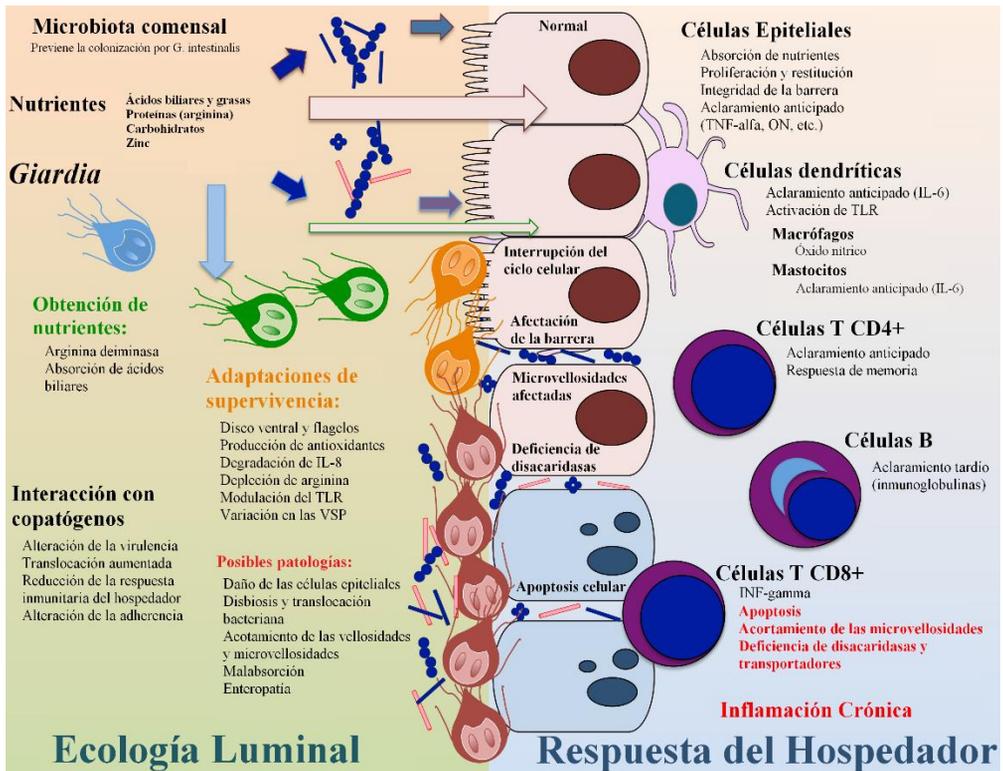


Figura 11. Modelo complejo de la patogénesis de *G. intestinalis* y factores determinantes de la misma, dependientes del ecosistema intestinal y de la respuesta del hospedador.

Fuente: adaptado de Bartelt & Sartor, 2015.

Giardia intestinalis se considera un protozoo luminal debido a que suele encontrarse en la superficie apical de los enterocitos sin invadir la barrera intestinal, sin embargo, se ha documentado la capacidad del parásito de atravesarla en algunos casos excepcionales (Brandborg et al., 1967; Saha & Ghosh, 1977; Martínez-Gordillo et al., 2014; Reynoso-Robles et al., 2015; Vivancos et al., 2018).

En la actualidad, se están llevando a cabo investigaciones centradas en el estudio del secretoma del parásito y su posible papel en los mecanismos de patogenicidad de la enfermedad, habiéndose identificado una gran variedad de moléculas asociadas a la

virulencia del parásito. Una de las moléculas secretadas por *G. intestinalis* mayoritariamente identificadas por la comunidad científica son la familia de las proteínas variables de superficie (VSP), proteínas ricas en cisteína cuya función es mediar la evasión inmunológica del parásito a través de la variación antigénica (Allain et al., 2017; Manko-Prykhoda et al., 2020).

Amat y colaboradores (2017) estudiaron la presencia de diferentes moléculas como las cisteína proteasas (CPs), capaces de degradar la capa mucosa protectora intestinal, de reducir las reservas de mucinas intercelulares MUC2 y afectar a la secreción del mucus. Además, las CPs también son capaces de degradar diferentes tipos de quimioquinas con efecto defensor frente a patógenos, como las CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL-8, CCL2 y CCL20, modulando la respuesta inmunológica del hospedador (Liu et al., 2018). En este estudio también se observó una alteración de la permeabilidad del epitelio intestinal que dio lugar a la translocación de la microbiota bacteriana comensal hacia diferentes órganos causando una respuesta inflamatoria acusada (Halliez et al., 2016; Amat et al., 2017).

Ma'ayeh y colaboradores (2017) mostraron que las proteínas arginina deiminasa (ADI) y ornitina carbamoiltransferasa (OCT) (también conocida como ornitina transcarbamilasa, OTC) participan en la producción de energía y limitan la formación de óxido nítrico (NO) modulando la respuesta inmunitaria del hospedador, facilitando, de esta forma, la infección (Coelho & Singer, 2018). Además, determinaron diferentes tenascinas, proteínas con una posible implicación en la señalización celular, adhesión, interacción proteína-proteína, e, incluso, en la inmunidad innata del hospedador (Ma'ayeh et al., 2017).

Faria y colaboradores (2020) también demostraron la capacidad del parásito de modular la respuesta inflamatoria producida por los macrófagos durante la infección

Introducción

mediante la degradación del Factor Nuclear-kappa B (NF- κ B) por diferentes proteasas (CPs y metaloproteasas), reduciendo la liberación de citoquinas inflamatorias (Interleuquina 1beta (IL-1 β) e IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la producción de NO.

En el estudio realizado por Dubourg y colaboradores (2018) se analizó la implicación de moléculas como la piridoxamina 5'-fosfato oxidasa (PNPO), una nucleasa extracelular, la *Giardia* Catepsina B (GCATBs) y las tenascinas, entre otras, con una posible implicación en la degradación de la capa mucosa intestinal y la afectación de las uniones estrechas, aumentando la permeabilidad intestinal y favoreciendo la apoptosis.

Por otra parte, existen grupos de investigación que se han centrado en el estudio de los mecanismos que podrían conferir a *G. intestinalis* un efecto protector e inmunomodulador frente a las respuestas inflamatorias patológicas causadas por otros enteropatógenos. El estudio realizado por Cotton y colaboradores (2014a) demuestra la capacidad de *G. intestinalis* de modificar la respuesta inflamatoria del hospedador frente a otros estímulos mediante la secreción de catepsina B, cisteína proteasa que degradan mediadores proinflamatorios como la Interleuquina-8 quimioatrayente de neutrófilos (IL-8). Otro estudio realizado por Manko-Prykhoda y colaboradores (2020) observó que *G. intestinalis* es capaz de proteger al hospedador frente a otros patógenos intestinales modulando la respuesta inmunitaria innata mediante la activación del inflammasoma NLRP3 que induce la producción de diferentes péptidos antimicrobianos (AMP) dando lugar a la disminución de la severidad de la enfermedad (Manko et al., 2017; Manko-Prykhoda et al., 2020). Además, Cotton y colaboradores (2014b) también muestran la capacidad de *G.*

intestinalis de atenuar la producción de citoquinas proinflamatorias en biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn.

Aunque, en la literatura científica no existe una evidencia concluyente del papel de los diferentes genotipos/subgenotipos en la virulencia del parásito y en la gravedad de la giardiosis, se ha podido observar que los genotipos causantes de infección en humanos son capaces de producir diferentes metabolitos que podrían contribuir a su patogenicidad (Feng & Xiao, 2011; Ma'ayeh et al., 2017). En los estudios realizados por Ma'ayeh y colaboradores (2017) se observaron algunas diferencias en los secretomas de los genotipos A o B: en las proteínas antioxidantes secretadas y, por tanto, en la respuesta a un estrés oxidativo generado por el hospedador; en la respuesta inmunitaria innata frente al parásito por parte del hospedador, en la que se ha visto una activación del factor del complemento 3 solamente en aislados del genotipo B, variando la respuesta en ambos genotipos.

Sin embargo, aunque la ciencia ha avanzado en este campo, son necesarios más estudios que arrojen luz sobre los mecanismos por los que *G. intestinalis* protege o causa enfermedad al hospedador.

1.2.7. Diagnóstico

El diagnóstico habitual de *G. intestinalis* se realiza mediante la identificación de quistes o trofozoítos mediante el examen microscópico en una o varias muestras de heces en fresco, procesadas mediante diferentes técnicas de concentración (sulfato de zinc, formalina-éter, formalina-etil acetato, sistemas Parasep, etc.), fijadas con formalina u otro conservador, o teñidas (lugol, tricrómico, azul de metileno, Giemsa, etc.). *Giardia intestinalis* puede presentar patrones de emisión de quistes, entre los que encontramos la elevada excreción, en la se pueden observar quistes en todas

Introducción

las muestras del paciente, una baja excreción, en la que se observan quistes solamente en el 30% de las muestras, y una excreción mixta, en la que existen periodos de determinada duración de excreción elevada, seguidos de periodos de baja excreción (Trelis et al., 2019). Por lo que, el diagnóstico microscópico de solamente una muestra de heces presentaría una baja sensibilidad (40-46%) debido a la emisión intermitente de quistes, infradiagnosticando la infección (Jahan et al., 2014; Trelis et al., 2019); el empleo de tres muestras de heces obtenidas en días alternos junto con métodos de concentración aumentaría la sensibilidad de diagnóstico hasta un 85% (Koehler et al., 2014).

Actualmente, se sigue considerando al diagnóstico etiológico mediante microscopía óptica la técnica de referencia o “gold standard”. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad, al tiempo empleado, a las elevadas tasas de falsos negativos y a que es imprescindible personal cualificado, va en aumento el uso de otras técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad que complementen los resultados, con la finalidad de proporcionar un diagnóstico fiable (Soares & Tasca, 2016).

Otras técnicas empleadas en el diagnóstico de *G. intestinalis* son los métodos inmunológicos, que constan de inmunoensayos para la detección de anticuerpos frente al parásito o antígenos del protozoo en muestras fecales con la ventaja de realizar el cribado de gran número de muestras y obtener el resultado en pocas horas, sin embargo, el coste suele ser elevado. Los más utilizados son la Inmunofluorescencia directa (DFA, por sus siglas en inglés, Direct Fluorescent Antibody), que utiliza un anticuerpo monoclonal para la detección de antígenos específicos e identificar, de esta forma, el organismo intacto con una sensibilidad y especificidad del 94% y 98%, respectivamente (Leung et al., 2019; Rumsey &

Waseem, 2020), y los enzimoimmunoensayos (EIA, por sus siglas en inglés, Enzyme Immunoassays), que son capaces de detectar antígenos solubles mediante espectrofotometría, con una sensibilidad y especificidad del 94-97% y 96-100%, respectivamente (Rumsey & Waseem, 2020). Dentro de los EIA podemos destacar el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), capaces de detectar antígenos específicos de *G. intestinalis*, con múltiples kits comerciales disponibles para su diagnóstico. El antígeno más utilizado es el GSA-65, presente tanto en trofozoítos como en quistes, y presentando una sensibilidad entre el 95-100% y una especificidad del 100%, siendo capaz de detectar un 30% aproximadamente más casos que el examen microscópico (Hooshyar et al., 2019).

Además, se han desarrollado diferentes ensayos para detección de anticuerpos frente al parásito como el ELISA (directo e indirecto), western blot, etc. En el caso de muestras de sangre, la detección de anticuerpos del tipo inmunoglobulinas G (IgG), no sería un parámetro fiable para el diagnóstico de la parasitosis puesto que dichos anticuerpos son capaces de permanecer elevados hasta 18 meses tras la erradicación del parásito. En el caso de muestras de saliva, la infección activa por *G. intestinalis* induce la producción de IgAs a nivel de mucosa, las cuales disminuirán rápidamente tras superarse la infección dada su corta vida media, por lo que su detección sería indicativa de un diagnóstico positivo (Hooshyar et al., 2019; Trelis et al., 2019).

Continuando con los métodos diagnósticos, se pueden encontrar en el mercado los test rápidos de detección de antígenos en heces que utilizan técnicas inmunocromatográficas no enzimáticas. Este método se realiza en tiras reactivas donde el complejo antígeno-anticuerpo se muestra mediante una banda visible a

Introducción

simple vista. Esta técnica presenta la ventaja de detectar antígenos de diferentes parásitos intestinales en una misma reacción como *G. intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* y *Entamoeba histolytica/dispar*. Sin embargo, aunque el método es sencillo y rápido (10-15 min) la sensibilidad y la especificidad es baja, especialmente en infecciones crónicas con una emisión baja o intermitente de quistes (Hooshyar et al., 2019; Rumsey & Waseem, 2020).

Por otra parte, el diagnóstico molecular de las parasitosis se encuentra en alza y, aunque, suele quedar relegado a laboratorios de investigación, está aumentando el interés por parte de la sanidad pública en implementarlo como protocolo diagnóstico de rutina en forma de paneles multiplex de detección simultánea y a tiempo real de enteropatógenos humanos. La técnica utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional o a tiempo real, que es capaz de amplificar y detectar secuencias específicas del genoma de *G. intestinalis* con concentraciones de 1 a 10 parásitos, asimismo, permite la diferenciación entre los diferentes genotipos/subgenotipos mediante secuenciación (Hooshyar et al., 2019; Leung et al., 2019). Los genes diana más utilizados son los que codifican el ARN ribosomal de la subunidad pequeña (*SSU*), el enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*), la proteína β -giardina (*bg*) y el enzima triosa fosfato isomerasa (*tpi*) (Hooshyar et al., 2019; Leung et al., 2019). Para la PCR a tiempo real se ha documentado una sensibilidad y especificidad del 92-98% y del 100%, respectivamente (Hooshyar et al., 2019; Leung et al., 2019). Debido a su rendimiento, ha sido comparada en múltiples estudios con otras técnicas diagnósticas como la microscopía y ELISA obteniendo mejores resultados, y una mayor sensibilidad y especificidad (Ryan & Cacciò, 2013; Hooshyar et al., 2019), como en el estudio realizado por Hijawi y colaboradores (2018) donde obtuvieron una sensibilidad y especificidad mucho

mayor mediante PCR a tiempo real (qPCR) (89,9 y 82,9%, respectivamente) en comparación con el ELISA (76,5 y 68%, respectivamente).

En los casos con sintomatología y sospecha de giardiosis en los que el diagnóstico parasitológico convencional no pueda ser confirmado por las técnicas disponibles, puede ser útil el examen del aspirado duodenal o biopsia de tejido de la zona del duodeno obtenidos mediante endoscopia o Enterotest (Hooshyar et al., 2019).

Estas pruebas, aunque se consideran invasivas, pueden aportar datos interesantes para realizar un diagnóstico diferencial, como puede ser la Enfermedad celíaca (EC) o la Enfermedad de Crohn (E. Cr).

1.3. *Blastocystis* sp.

1.3.1. Descripción

Blastocystis (anteriormente denominado *Blastocystis hominis*) (Figura 12) es un parásito eucariota unicelular con una amplia diversidad genética que pertenece al Reino Protista (Chromista) y Filo Stramenopiles, un conjunto complejo y heterogéneo de organismos eucariotas heterotróficos y fotosintéticos (Cifre et al., 2018; Adl et al., 2019; Stensvold et al., 2020). *Blastocystis* es un parásito distribuido a nivel mundial que afecta el intestino grueso de humanos y animales (mamíferos, aves, reptiles, anfibios e insectos), siendo el único Stramenopiles que se asienta en el último tramo del tracto digestivo (Cifre et al., 2018; CDC, 2019; Stensvold et al., 2020).

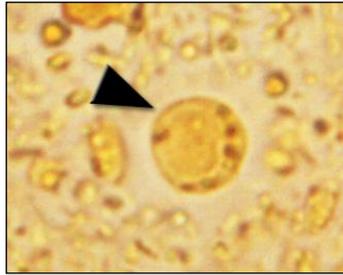


Figura 12. Visualización de *Blastocystis* sp. en tinción de lugol mediante microscopía.

Fuente: CDC, ID# 18466. Disponible en:
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=18466>.

La clasificación de *Blastocystis* sp. ha sido modificada a lo largo de los años debido a su morfología y características genéticas. En la Tabla 3 se muestra la taxonomía y clasificación actual (Adl et al., 2019; Stensvold et al., 2020).

Tabla 3. Taxonomía y clasificación de <i>Blastocystis</i> sp. (NCBI, s.f.-a; Stensvold et al., 2020)	
REINO	Protista, Chromista, Supergrupo Sar
FILO	Stramenopila o estramenopilos
CLASE	Bigyra
ORDEN	Opalinata
FAMILIA	Blastocystidae
GENERO	<i>Blastocystis</i>
ESPECIE	Actualmente no aplicable

Blastocystis sp. fue descubierto por Swayne y Brittan en 1849, considerándolo el patógeno causante de la epidemia del cólera (Swayne, 1849; Salinas & Vildozola, 2007), pero no fue descrito hasta 1911 por Alexeieff, que lo denominó *Blastocystis enterocola* y lo clasificó como una levadura debido a su similar apariencia y a la falta de estructuras de movilidad (Alexeieff, 1911). En 1912, fue visualizado en materia fecal humana por Brumpt que lo describió como una levadura inocua, pero de

importancia debido a que podía ser confundida con *E. histolytica*, denominándolo *Blastocystis hominis*, término aceptado por la comunidad científica hasta los últimos años (Brumpt, 1912). En 1967, Zierdt lo clasificó como un protozoo apicomplexa debido a sus características y orgánulos similares (Zierdt, 1991). En la última década, gracias a las técnicas de biología molecular, *Blastocystis* ha sido reclasificado en el Reino Chromista y filo Stramenopiles, dejando de ser considerado un protozoo. Además, se aceptó la nomenclatura "*Blastocystis* sp." debido a su amplia diversidad y a que el término "*hominis*" no representaba a la gran variedad de organismos dentro del mismo grupo, siendo diferenciados entre ellos por la terminología "subtipos" (Salinas & Vildozola, 2007; Stensvold et al., 2007). En 2019, la nomenclatura "*Blastocystis*" también fue aceptada por la comunidad científica (Adl et al., 2019; Stensvold et al., 2020).

Blastocystis es un organismo anaerobio estricto aciliado y osmótrofo (obtiene los nutrientes mediante absorción osmótica de sustancias disueltas). Presenta en su estructura núcleo celular, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y unos orgánulos similares a las mitocondrias que están implicados en múltiples vías metabólicas como el metabolismo de los aminoácidos y síntesis de fosfolípidos esenciales, entre otras, que facilitan la supervivencia del parásito (Clark et al., 2013; Parija & Jeremiah, 2013). Además, se han identificado varias enzimas clave implicadas en el metabolismo energético de *Blastocystis* que se activan en presencia de metabolitos bacterianos, la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), implicada en el metabolismo de los carbohidratos catalizando la conversión de piruvato en acetil-CoA y CO₂, y la [FeFe] hidrogenasa, implicada en el metabolismo del hidrógeno (Yason et al., 2019).

Además, *Blastocystis* es capaz de producir auto-apoptosis cuando las condiciones del medio son adversas, como un ambiente aeróbico o presencia de sustancias antiparasitarias (ej. metronidazol) como mecanismo para generar células viables en condiciones de estrés (Parija & Jeremiah, 2013).

1.3.2. Morfología

Blastocystis presenta una gran diversidad morfológica con variaciones considerables de forma y tamaño, entre los 5-40 μm de diámetro (Parija & Jeremiah, 2013). En su forma más frecuente se aprecian como células redondeadas similares a levaduras, hialinas y refringentes (Adl et al., 2019).

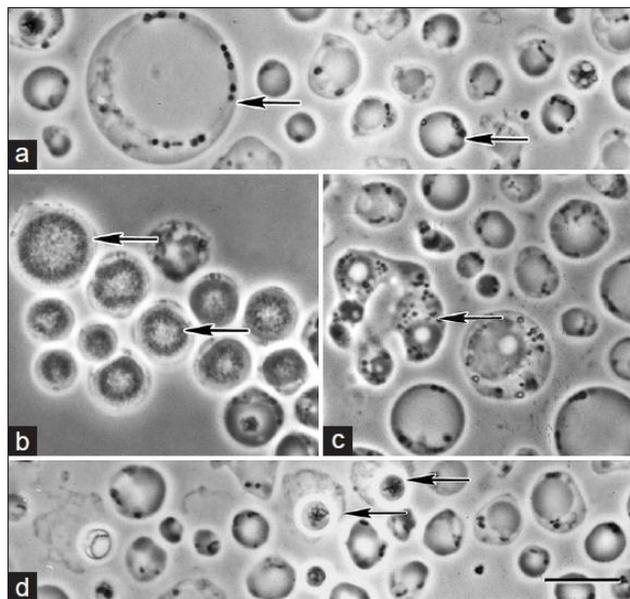


Figura 13. Formas morfológicas de *Blastocystis* mediante microscopía de contraste: a) Formas vacuolares de diferentes tamaños y vacuola central (flechas); b) Formas granulares con inclusiones granulares en el interior de la vacuola central; c) Forma ameboidea con pseudópodos característicos; d) Quistes de pequeño tamaño rodeados de una capa externa irregular.

Fuente: Parija & Jeremiah, 2013 (adaptado de Tan, 2008).

En la literatura, se han descrito 4 formas de *Blastocystis* (Tan, 2008): vacuolar, granular, ameboide y quiste (Figura 13). La forma vacuolar es la forma más frecuente tanto en muestras de heces como en cultivo. Algunos autores sugieren que algunas de las formas observadas en cultivos *in vitro* se originan debido a una exposición a oxígeno y no son comunes *in vivo* (Clark et al., 2013).

- **Forma vacuolar (Figura 13, a):**

Forma más frecuente de identificación de *Blastocystis* mediante microscopía óptica en cultivos o muestras de heces. La célula es esférica y presenta diferentes tamaños, oscilando entre 2-200 μm de diámetro. También suele denominarse “forma central” debido a la gran vacuola central que presenta y que ocupa el 90% del volumen de la célula, de la que se ha sugerido una función de almacenamiento de la vacuola central (carbohidratos, lípidos, etc.). La periferia alberga el núcleo, citoplasma y los orgánulos. Esta forma presenta una capa superficial de diferente grosor conocida como capa fibrilar o cápsula (Tan, 2008; Ash & Orihel, 2010; Scanlan, 2012).

- **Forma granular (Figura 13, b):**

Presenta una morfología similar a la vacuolar, exceptuando por la presencia de gránulos heterogéneos en el interior de la vacuola central o, incluso, el citoplasma. Algunos autores han sugerido una función de estos gránulos reproductiva o metabólica, entre otras, pero no se ha demostrado en la actualidad (Tan, 2008; Ash & Orihel, 2010; Scanlan, 2012). Según Tan (2008) esta forma suele observarse con mayor frecuencia en cultivos envejecidos o tratados con antibióticos.

- Forma ameboide (Figura 13, c):

Esta forma es poco frecuente y con una forma similar a las amebas de diferentes morfologías y tamaños (10-15 μm), y la presencia de uno o dos pseudópodos largos. Aun así, es una célula inmóvil y adhesiva. Algunas células pueden presentar características similares a la forma vacuolar, con vacuola central, capa superficial y numerosos orgánulos en las extensiones citoplasmáticas de los pseudópodos. Sin embargo, múltiples descripciones se han publicado en la literatura científica (Tan, 2008; Scanlan, 2012).

- Quiste (Figura 13, d):

El quiste es una célula esférica u ovoide de pequeño tamaño (2-5 μm) con una gruesa pared de múltiples capas. Carece de vacuola central y puede contener de 1 a 4 núcleos, orgánulo similar a mitocondria, depósitos de glucógeno y pequeñas vacuolas. El quiste se considera la forma de resistencia y transmisión del parásito, siendo capaz de sobrevivir en condiciones adversas. Se ha reportado que puede sobrevivir en agua a temperatura ambiente durante 19 días, e incluso 1 o 2 meses a 25°C y a 4°C, respectivamente (Tan, 2008; Ash & Orihel, 2010; Scanlan, 2012).

1.3.3. Ciclo biológico

Según el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (2019), el ciclo de vida de *Blastocystis* todavía no está establecido definitivamente, sigue habiendo dudas sobre la forma infectante del parásito y si las múltiples formas constituyen diferentes etapas biológicas en el sistema intestinal de los hospedadores. No obstante, es la forma quística la que se postula como la forma infectante y transmisible en un ciclo

de vida considerado monoxeno (Figura 14) (Tan, 2008; Amaya et al., 2015; CDC, 2019).

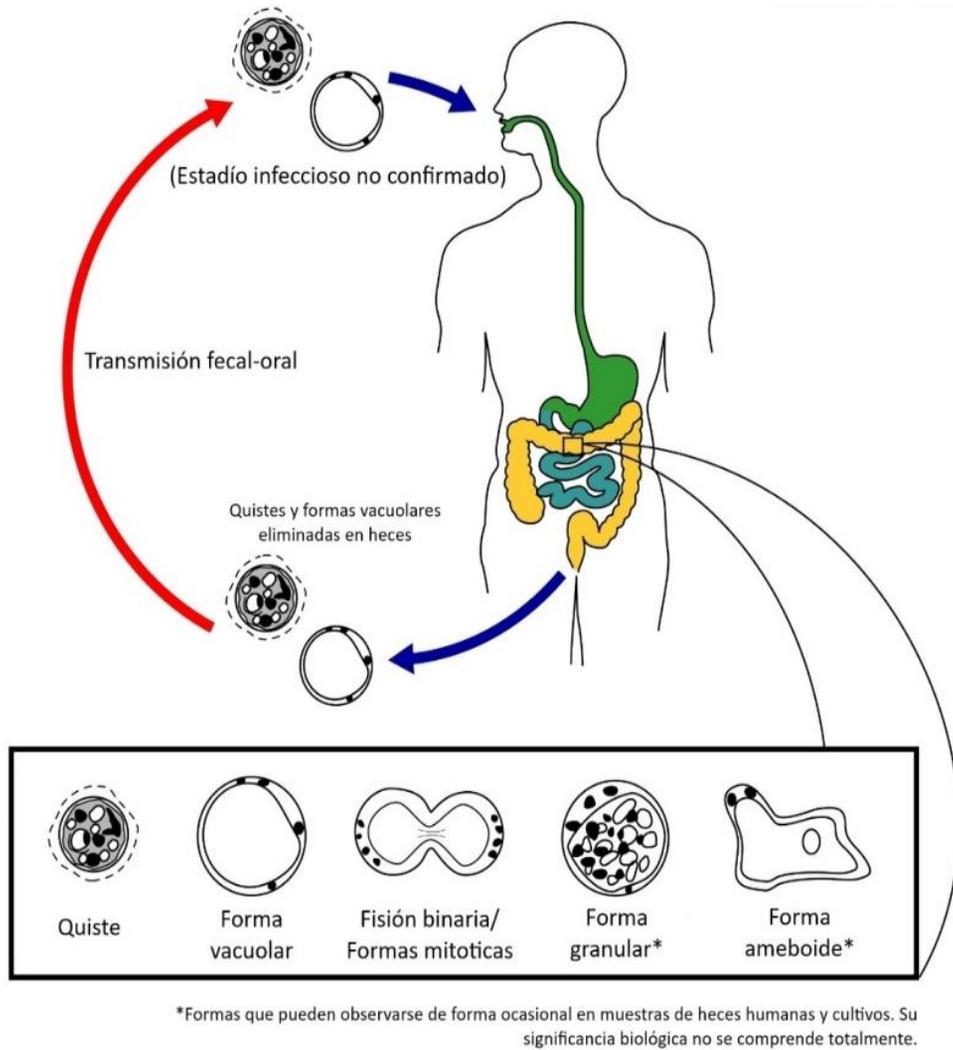


Figura 14. Ciclo de vida de *Blastocystis*.

Fuente: adaptado de CDC, 2019.

El quiste debe ser ingerido por el hospedador mediante transmisión fecal-oral, ya sea por contacto directo con personas o animales infectados, o mediante el

consumo de alimentos o aguas contaminados (Tan, 2008; Amaya et al., 2015; CDC, 2019). Al alcanzar el estómago, se produce el desenquistado por acción de los ácidos y enzimas gástricos, liberando en el intestino grueso la forma vacuolar del parásito, que parece ser que se replica mediante fisión binaria, aunque se encuentra todavía en estudio. Finalmente, tras recorrer el tracto intestinal se produce el enquistado para generar la forma de resistencia o quiste que será liberada al exterior junto con las heces, además, también se está comenzando a considerar a la forma vacuolar, muy frecuente en muestras fecales, como un estadio infeccioso del parásito (Tan, 2008; CDC, 2019; Stensvold et al., 2020). Algunos autores hipotetizan sobre la existencia de diferentes tipos de quiste: de pared gruesa, con un papel importante en la transmisión externa del parásito, y de pared fina, responsable de la autoinfección del hospedador actual (Tan, 2008; Parija & Jeremiah, 2013; Amaya et al., 2015).

Algunos estudios indican que la forma vacuolar es capaz de transformarse en el resto de las formas en el tracto intestinal, sin embargo, existe controversia del papel biológico que las forma granular y ameboide desempeñan siendo necesaria una investigación más profunda para aclarar su función (Tan, 2008; Parija & Jeremiah, 2013; Amaya et al., 2015).

1.3.4. Epidemiología

Blastocystis se considera un parásito ubicuo con una distribución mundial, estimándose que más de 1000 millones de personas son portadoras de este protista en todo el mundo (Andersen & Stensvold, 2016; de la Cruz & Stensvold, 2017; Cifre et al., 2018; Stensvold et al., 2020).

La prevalencia de *Blastocystis* varía entre países e, incluso, entre comunidades de un mismo país, con porcentajes de infección entre el 0,5% y el 80% tanto en personas sintomáticas como asintomáticas, y siendo más común en personas adultas (Butters et al., 2019). En los países en vías de desarrollo se pueden alcanzar prevalencias del 60% e incluso superiores, llegando al 100% (El Safadi, 2014), debido principalmente a unas condiciones higiénico-sanitarias y planes de saneamiento deficientes, contacto directo con animales y/o consumo de aguas y alimentos contaminados (Amaya et al., 2015; Andersen & Stensvold, 2016; de la Cruz & Stensvold, 2017). Sin embargo, en los países industrializados se recogen prevalencias entre 3%-13% (Subirats & Borrás, 2018; Trelis et al., 2019; Muadica et al., 2020), mostrando algunos estudios cifras superiores en nuestro país y países del norte de Europa (18% y 25,8%, respectivamente) en pacientes con sintomatología gastrointestinal y, muchos de ellos, inmigrantes (Ocaña-Losada et al., 2018; de Boer et al., 2019). No obstante, los datos mencionados proceden de estudios que emplean una amplia variedad de métodos diagnósticos con niveles de sensibilidad diferentes, por lo que, puede que no sean representativos de las prevalencias reales de *Blastocystis* (Tan, 2008; de la Cruz & Stensvold, 2017).

La amplia distribución y elevadas prevalencias de este protista también pueden deberse a su potencial zoonótico, pudiendo ser transmitido de animales a humanos, y viceversa (Tan, 2008; de la Cruz & Stensvold, 2017; Cifre et al., 2018). Estos animales actuarían como reservorio del parásito, siendo los más comunes los cerdos, vacas, primates, aves, roedores, reptiles y anfibios, entre otros (Tan, 2008; Amaya et al., 2015).

1.3.5. Subtipos de *Blastocystis* sp.

Se ha descrito una amplia variabilidad genética de *Blastocystis* en la literatura científica, tanto de aislados humanos como de animales (Tan, 2008). Actualmente, 27 subtipos (ST) han sido identificados mediante el análisis de los genes que codifican el RNA de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA) del parásito (Stensvold & Clark, 2020; Maloney & Santin, 2021; Maloney et al., 2021). Múltiples subtipos de *Blastocystis* se han propuesto desde el año 2013 (ST18-31), sin embargo, Stensvold y Clark (2020) consideran que los ST 18-20 y ST22 no son válidos ya que aparentan ser quimeras moleculares generadas a partir del material genético de dos subtipos diferentes en una misma muestra. No obstante, ya se dispone de la mayor parte de las secuencias de los subtipos ST21 y ST 23-31, siendo reconocidos como nuevos subtipos por la comunidad científica (Maloney & Santin, 2021; Maloney et al., 2021).

En humanos se han descrito los primeros 9 subtipos (ST1-ST9) y el ST12, considerando al resto de los ST exclusivos de especies animales (Ramírez et al., 2016; Stensvold et al., 2020), sin embargo, un estudio reciente identificó por primera vez los subtipos ST10 y ST14 en niños de Senegal, subtipos considerados hasta la fecha únicamente de animales (Khaled et al., 2020). Además, se han identificado animales que actúan como reservorio para todos los subtipos avalando el potencial zoonótico del parásito, como se muestra en la Figura 15 (Tan, 2008; Amaya et al., 2015; Stensvold & Clark, 2020; Stensvold et al., 2020). No obstante, algunos autores sugieren una transmisión zoonótica baja (Paulos et al., 2018; Stensvold et al., 2020).

En general, más del 90% de los subtipos reportados en humanos pertenecen a los ST 1-4 (de la Cruz & Stensvold, 2017; Stensvold et al., 2020). Los ST 1-3 presentan una distribución global, siendo los más frecuentes en múltiples países de continentes

como, por ejemplo, África, América, Europa y Asia, destacando al ST3 como el más común a nivel mundial (Alfellani et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Ramírez et al., 2016; Khademvatan et al., 2018; Jiménez et al., 2019; Gabrielli et al., 2020b; Khaled et al., 2020; Lhotská et al., 2020; Ning et al., 2020). Por el contrario, el ST4 parece ser mucho más frecuente en los países del continente europeo (Domínguez-Márquez et al., 2009; Alfellani et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Gabrielli et al., 2020b). Los ST5-8 se encuentran con menor frecuencia en humanos y en mayor medida en ciertos animales, transmitiéndose posiblemente de forma zoonótica (Figura 15) (de la Cruz & Stensvold, 2017). Respecto al ST9, algunos estudios reportan su presencia en humanos y en raras ocasiones (Yoshikawa & Iwamasa, 2016; Sheikh et al., 2020), mientras que otras investigaciones muestran infecciones por este subtipo en animales como pollos y lémures (Figura 15) (Ma et al., 2020; Rauff-Adedotun et al., 2020).

Además, se ha observado una notable diversidad genética tanto dentro como entre los diferentes subtipos, por ejemplo, el ST3 presenta una gran diversidad o variabilidad intragénica, mientras que el ST4 permanece bien conservado. Estos datos sugieren una mayor coevolución del ST3 con el ser humano en comparación con el ST4 (Stensvold et al., 2012; Cifre et al., 2018; Stensvold & Clark, 2020).

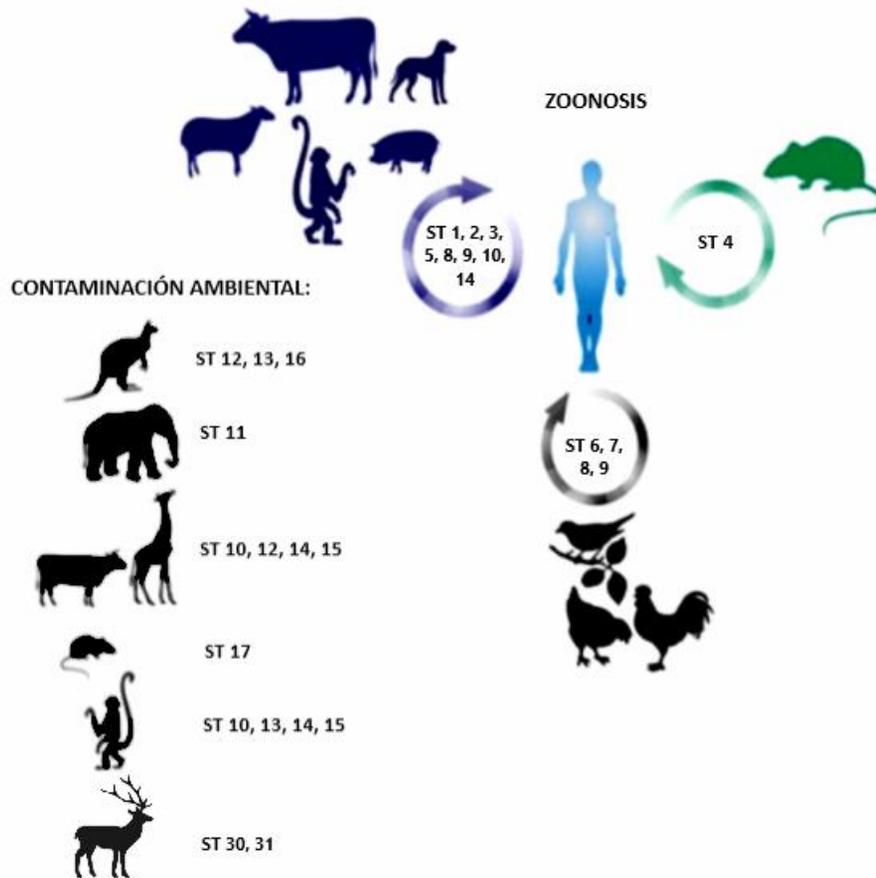


Figura 15. Carácter zoonótico de los subtipos (ST) de *Blastocystis*.

Fuente: adaptado de Amaya et al. (2015).

1.3.6. Potencial patógeno

Actualmente existe una gran controversia en torno al papel patógeno de *Blastocystis*, debido a que, en múltiples estudios, se encuentra una prevalencia similar en personas sintomáticas y asintomáticas (Kumarasamy et al., 2018). *Blastocystis* es considerado como un patógeno oportunista, que manifiesta su poder patógeno ante un sistema inmunitario debilitado, y asociado a sintomatología

intestinal inespecífica, como diarrea, estreñimiento, dolor y distensión abdominal, flatulencias, vómitos, etc.; y extraintestinal, como urticaria o trastornos cutáneos, pérdida de peso y fatiga crónica (Cifre et al., 2018; Skotarczak, 2018). Asimismo, se ha relacionado con enfermedades del tracto digestivo como el Síndrome de Intestino Irritable, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, disbiosis, etc. (Yakoob et al., 2010a; Poirier et al., 2012; Nourrisson et al., 2014; Cifre et al., 2018; Kök et al., 2019; Tito et al., 2019; Yason et al., 2019; Deng et al., 2021). Sin embargo, en un nuevo enfoque respecto al parásito, existen autores que lo consideran un organismo comensal debido a su elevada prevalencia en población sana asociado con una microbiota con una gran diversidad taxonómica (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramírez et al., 2018; Mardani et al., 2019; Reh et al., 2019; Tito et al., 2019; de Boer et al., 2020; Gabrielli et al., 2020b; Stensvold et al., 2020; Deng et al., 2021), no pudiendo confirmar su poder patógeno. Incluso algunos autores sugieren que *Blastocystis* podría actuar como biomarcador de la homeostasis del ambiente intestinal y de la diversidad microbiana (Figura 16) (Scanlan & Stensvold, 2013).

Debido a los datos contradictorios encontrados en la literatura científica, se ha sugerido una asociación entre la patogenicidad de *Blastocystis* y la sintomatología y/o patología con factores asociados al parásito, como el subtipo causante de la infección (Domínguez-Márquez et al., 2009; Yakoob et al., 2010b; Tan et al., 2010, Poirier et al., 2012; Yason et al., 2019), y al hospedador, como el estado inmunológico, el ambiente intestinal y la composición de la microbiota (Scanlan et al., 2014; Yason et al., 2019; Figueroa-Lara et al., 2020; Gabrielli et al., 2020b; Deng et al., 2021) (Figura 16).

Introducción

Gran variedad de estudios han tenido como objetivo ampliar el conocimiento sobre la patogenicidad de *Blastocystis* *in vitro* e *in vivo*, observándose que el parásito es capaz de provocar una alteración de la función barrera intestinal aumentando la permeabilidad, lo que puede dar lugar a trastornos de la motilidad e hipersensibilidad (Tan et al., 2010; Poirier et al., 2012; Cifre et al., 2018; Stensvold et al., 2020). Esto puede ser debido a la inducción por *Blastocystis* de la vía Rho/ROCK-quinasa que afecta a las uniones estrechas entre los enterocitos observada *in vitro*, aunque se desconoce si este proceso ocurre *in vivo* (Tan et al., 2010; Stensvold et al., 2020).

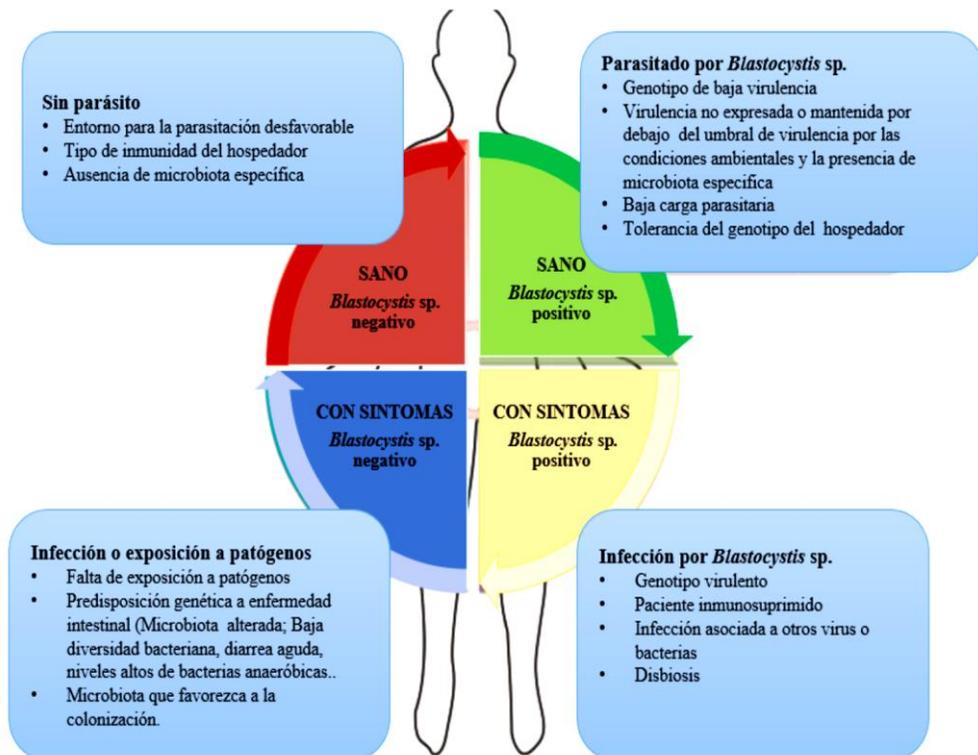


Figura 16. Posibles interacciones entre *Blastocystis* y el estado sintomático del hospedador.

Fuente: Taroncher (2019).

Se ha observado que *Blastocystis*, *in vitro*, es capaz de inducir el proceso de apoptosis dependiente de las caspasas 3 y 9 de las células intestinales del hospedador, aumentando la permeabilidad intestinal y perdiendo la función barrera (Wu et al., 2014a, 2014b; Kapczuk et al., 2020). Wu y colaboradores (2014b) observaron que el subtipo ST7, aislado de un paciente sintomático, fue capaz de activar este mecanismo en la línea celular epitelial humana Caco-2, mientras que un aislado ST4 de ratón no. Sin embargo, el estudio realizado por Puthia y colaboradores (2006) mostraron que el ST4 podía generar apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 en la línea celular epitelial de ratas IEC-6. Lo que sugiere que existe una especificidad del hospedador y diferencias en la virulencia de los diferentes ST, lo que explicaría las elevadas tasas de personas asintomáticas. No obstante, son necesarios estudios para demostrar que ocurre de igual forma *in vivo*.

La modulación del sistema inmunológico por *Blastocystis*, *in vitro*, también ha sido evidenciada, proporcionando información sobre la interacción del parásito y hospedador y su posible influencia en la composición de la microbiota intestinal (Tan et al., 2010; Yason et al. 2019; Deng et al., 2021) (Figura 17). Esta inmunomodulación generaría el ambiente idóneo para la supervivencia del protista, pero podría facilitar de forma indirecta la presencia de otros patógenos oportunistas y generar inflamación de bajo grado, daño tisular y alteraciones gastrointestinales (Tan et al., 2010; Ajampur & Tan, 2016; Cifre et al., 2018). *In vitro*, se ha observado la liberación de factores de virulencia, como cisteína proteasas capaces de producir la degradación de las IgA (Puthia et al., 2005), la inhibición del enzima iNOS (Mirza et al., 2011), la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) con el consiguiente incremento de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 8 (IL-8) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en células intestinales (Puthia et al., 2008), así como el aumento de la secreción de la

Introducción

interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por los macrófagos de ratón (Long et al., 2001; Lim et al., 2014). Además, algunos estudios realizados en modelos animales mostraron un aumento de citoquinas proinflamatorias interleuquinas 17 y 23 (IL-17 y IL-23) en ratones promoviendo una respuesta inflamatoria patogénica por activación de la vía Th17 (linfocitos T helper 17) (Wu et al., 2012). Además, se ha observado la capacidad del ST7 de sintetizar enzimas como la policétido sintasa (PKS, por sus siglas en inglés) y la policétido no ribosomal sintasa (NRPS, por sus siglas en inglés) que generan péptidos no ribosomales y policétidos con capacidad inmunomoduladora y antibiótica que podrían participar en la inflamación intestinal y alteración de la microbiota (Poirier et al., 2012) (Figura 17).

Blastocystis es capaz de secretar otras proteasas, como las hidrolasas observadas en el ST7, las cisteína y serina proteasas, que son capaces de alterar la capa mucosa intestinal mediante la degradación de glicoproteínas para obtener fuentes de nutrientes y generar un microambiente necesario para su supervivencia (Poirier et al., 2012; Wawrzyniak et al., 2012; Yason et al., 2019) (Figura 17). La degradación de esta capa supondría el primer paso para la exposición del epitelio intestinal a los antígenos del lumen generando una respuesta inflamatoria y alérgica, además de permitir la unión de estas moléculas y a las proteasas a los receptores de la superficie celular, como el receptor activado por proteasa 2 (PAR-2), induciendo inflamación, alteración de las uniones estrechas e hipersensibilidad, que contribuirían a los síntomas intestinales en pacientes con infección sintomática (Tan et al., 2010; Poirier et al., 2012).

Otro de los efectos fisiopatológicos que se han atribuido en la infección por *Blastocystis* es un aumento del estrés oxidativo, ya que se ha observado que algunos

subtipos del parásito podrían inducir elevadas concentraciones de radicales libres en modelos animales, generando reacciones cutáneas como urticaria e, incluso, induciendo un aumento de la carcinogénesis (Chandramathi et al., 2010; Kumarasamy et al., 2017) (Figura 17).

Con todo ello y a modo de resumen, en la Figura 17 se muestra un modelo de patogénesis de *Blastocystis* que podría desencadenar una sintomatología compatible con patologías intestinales como el SII (Cifre et al., 2018).

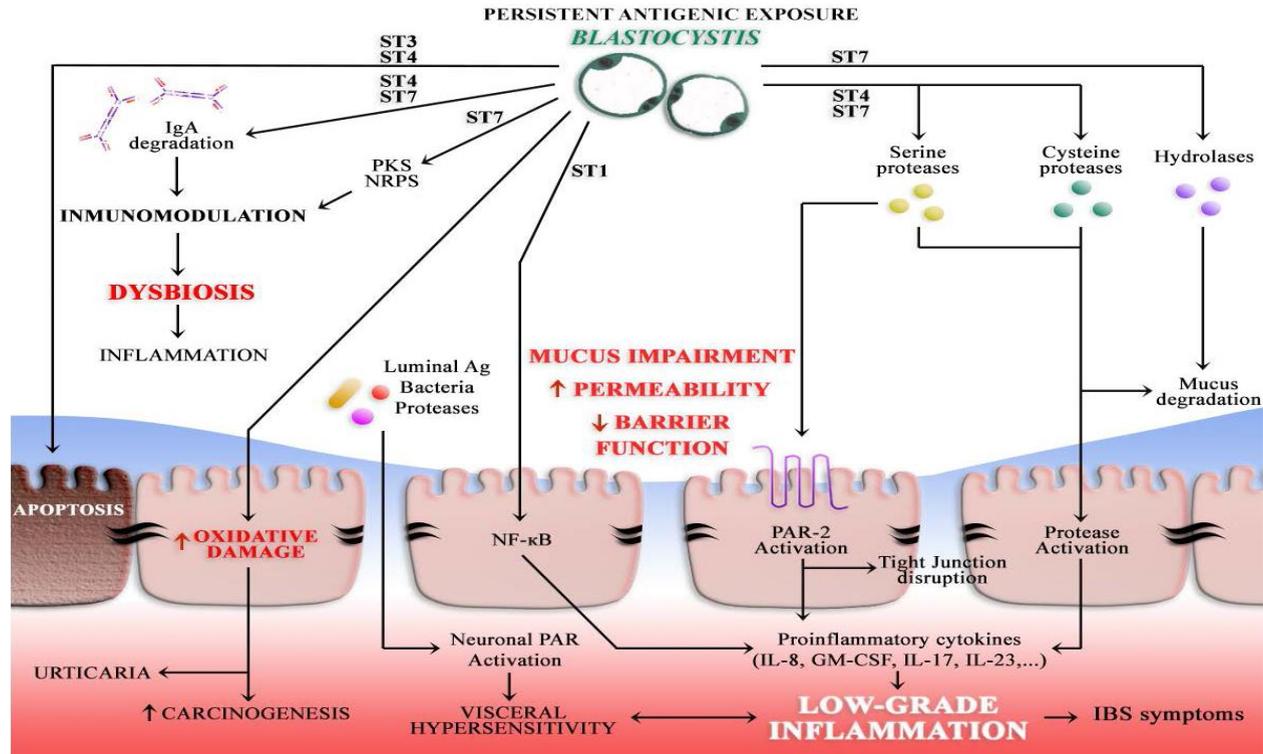


Figura 17. Visión general de los efectos fisiopatológicos de *Blastocystis* en la mucosa intestinal y mecanismos demostrados *in vitro* e *in vivo* con modelos animales en relación con subtipos específicos (ST1, ST3, ST4 y ST7). Ag: antígenos; IgA: inmunoglobulina A; IL-8: interleuquina 8; IL-17: interleuquina 17; IL-23: interleuquina 23; GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; NF-κB: factor nuclear kappa B; PAR: receptor activado por proteasa; PKS: polícétido sintasa; NRPS: polícétido no ribosomal sintasa.

Fuente: Cifre et al. (2018).

1.3.7. Diagnóstico

El diagnóstico habitual de *Blastocystis* se centra la identificación directa mediante microscopía óptica en una o varias muestras fecales, bien sea en fresco o procesadas mediante técnicas de concentración (formalina-éter, formalina-etil acetato, sistema Parasep, etc.), y bien fijadas con formalina o teñidas (Iugol, tricrómico, Giemsa, hierro-hematoxilina, etc.). Sin embargo, aunque presenta la ventaja de ser una técnica barata y asequible, la detección de las múltiples formas del parásito requiere de personal capacitado para evitar falsos negativos e infradiagnosticar la parasitación. Además, esta técnica no permite discernir entre los diferentes subtipos del parásito.

La sensibilidad para el diagnóstico convencional de *Blastocystis* es del 48% aproximadamente (Butters et al., 2019). En 2008, Tan sugirió el aumento del número de muestras fecales investigadas para aumentar la sensibilidad de la técnica, sin embargo, en el estudio realizado por Not y colaboradores (2020) no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad entre el análisis de una sola muestra fecal o el de dos o tres muestras consecutivas, reflejando la emisión regular de *Blastocystis* en heces. No obstante, otro estudio realizado por Roberts y colaboradores (2011) destacó la importancia de realizar el análisis parasitológico de más de una muestra para asegurar el correcto diagnóstico del protista.

Actualmente, la técnica considerada de referencia para la identificación de este protista es el cultivo axénico (medio de Jones, Robinson, etc.), método más sensible que la microscopía, con cifras entre el 52%-79% en comparación con qPCR, pero que requiere de un mayor tiempo y personal entrenado en el reconocimiento de las múltiples formas del parásito, por lo que no suele encontrarse disponible en la

Introducción

práctica clínica habitual (Verweij & Stensvold, 2014; Stensvold & Clark, 2016; del Coco et al., 2017; Mohammad et al., 2018b).

No obstante, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas específicas de biología molecular, como la PCR y qPCR, que presentan una mayor sensibilidad (hasta el 100%) y que permiten identificar los diferentes subtipos causantes de la infección (Scicluna et al., 2006; Roberts et al., 2011; El Safadi et al., 2014; Dacal et al., 2020). Sin embargo, debido a su complejidad y elevado coste, a la necesidad de equipos específicos y personal entrenado, no suelen emplearse en la clínica diaria, siendo utilizadas mayormente en centros de referencia o en investigación.

Existen otras técnicas para el diagnóstico de *Blastocystis* como enzimoimmunoensayos (ELISA-Ag) y métodos de inmunofluorescencia directa (DFA, por sus siglas en inglés) o indirecta (IFA), etc. Incluso, existen kits comerciales específicos para la detección del protista de forma rápida. Sin embargo, su uso se ha limitado a un número restringido de estudios con pocas muestras, por lo que es necesaria una mayor investigación para poder ser empleados en la práctica diaria (Verweij & Stensvold, 2014; Stensvold & Clark, 2016).

Por lo tanto, debido a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de las técnicas habitualmente empleadas, se recomienda el uso en la práctica clínica de la combinación de, al menos, 2 de las técnicas disponibles para realizar con mayor precisión el diagnóstico de *Blastocystis* (Roberts et al., 2011; Stensvold & Clark, 2016; del Coco et al., 2017; Mohammad et al., 2018b). Sin embargo, en el caso de que no se dispongan de técnicas moleculares se recomienda el uso combinado de microscopía y cultivo, ya que el uso de una sola técnica puede llevar a un infradiagnóstico de la infección (Roberts et al., 2011; Zhang et al., 2011; Mohammad et al., 2018b; Padukone et al., 2018).

2. TRASTORNOS GASTROINTESTINALES CRÓNICOS

Los Trastornos Intestinales Crónicos (TIC) son aquellas patologías que afectan al sistema intestinal con una duración superior a 6 meses, que presentan síntomas y signos diversos e inespecíficos como dolor abdominal, distensión abdominal, flatulencias, alteración del hábito intestinal (diarrea, estreñimiento o alternancia de ambos), etc.

En la presente tesis doctoral, además de los TIC, se han incluido patologías que afectan al sistema gástrico, considerándose el conjunto como Trastornos gastrointestinales crónicos (TGC), entre los que destacan: la Intolerancia/malabsorción a carbohidratos (fructosa (IF) y lactosa (IL)), la Enfermedad Celíaca (EC), el Síndrome de Intestino Irritable (SII), la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) (Enfermedad de Crohn (E. Cr) y Colitis Ulcerosa (CU)) y la gastritis crónica. A continuación, se realiza una breve descripción de cada una de ellas.

2.1. Intolerancia/malabsorción a Carbohidratos

En nuestra sociedad, los carbohidratos suponen aproximadamente un 50-55% de la energía total consumida a lo largo del día, siendo muy común la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos simples como los ultraprocesados. Los disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa, isomaltosa y trehalosa), constituyen un aporte importante en la ingesta diaria de la población y para su absorción requieren de un proceso de hidrólisis mediante enzimas específicas situadas en las microvellosidades

Introducción

intestinales del intestino delgado. La actividad enzimática ejercida en los disacáridos da lugar a monosacáridos como la glucosa, galactosa y fructosa, entre otros, que se absorben mediante transportadores específicos ubicados en las membranas apicales y basolaterales de los enterocitos (SGLT-1, GLUT-5 y GLUT-2) situados en intestino delgado (Figura 18) (Zugasti, 2009; Riveros et al., 2014).

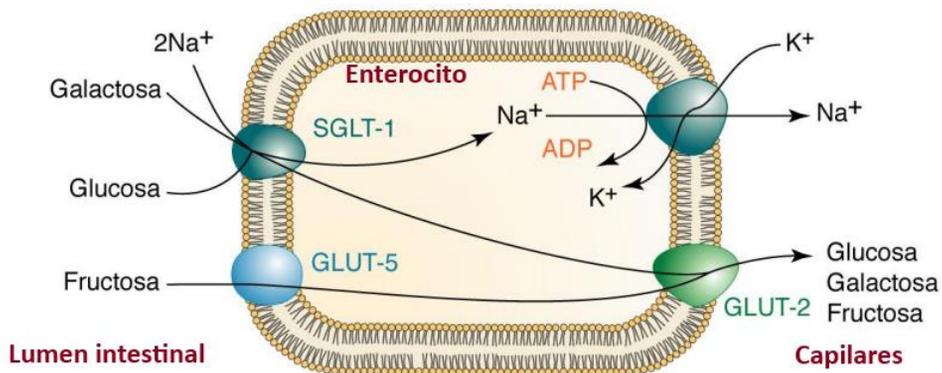


Figura 18. Proceso de absorción intestinal de los monosacáridos. SGLT-1: cotransportador activo de Na^+ para glucosa o galactosa; GLUT-5: transportador de fructosa; GLUT-2: transportador de glucosa, galactosa y fructosa hacia los capilares sanguíneos.

Fuente: <https://bioquiucimed.files.wordpress.com/2011/08/clase-digestic3b3n-y-absorcic3b3n-de-carbohidratos.pdf>.

En el caso de que existan problemas en la hidrólisis y/o absorción, estos carbohidratos transitarán hacia el intestino grueso proporcionando sustrato fermentable para la microbiota, generando un aumento de la osmolaridad en el lumen y la producción de gases como el CO_2 , entre otros procesos, que serán causantes del desarrollo de trastornos gastrointestinales (hipersensibilidad visceral) y la sintomatología característica (dolor y distensión abdominal, diarrea, flatulencias, náuseas, etc.), en un periodo de tiempo aproximado de 30 minutos y hasta las 2h tras la ingesta (Posovszky et al., 2019; Trelis et al., 2019; Hammer & Hammer, 2020).

En población general se desconoce la prevalencia de la intolerancia/malabsorción a carbohidratos, sin embargo, en pacientes con sintomatología gastrointestinal se estima un porcentaje del 60% para la fructosa, del 51% para la lactosa y el 33% para la combinación de ambos (Wilder-Smith et al., 2013).

En la presencia de intolerancia/malabsorción de lactosa (IL), se produce un déficit total o parcial de la enzima lactasa (β -galactosidasa), impidiendo una correcta hidrólisis y absorción del disacárido. Existen dos tipos: la primaria o hipolactasia adquirida, considerada la más común, en la que se produce un déficit genético de la enzima, cuya expresión y actividad se reducen con la edad, perdiendo la capacidad de tolerar la lactosa a lo largo de la vida; y la secundaria, en la que se produce una pérdida de la actividad lactasa de forma transitoria y reversible debido a otras patologías o condiciones que alteran la mucosa intestinal, como la EC, E. Cr, alergias a alimentos e, incluso, patógenos infecciosos que generen afectación de la integridad intestinal, ya sean virus, parásitos, bacterias u hongos (Deng et al., 2015; Taroncher, 2019; Posovszky et al., 2019; López et al., 2020).

En el caso de la intolerancia/malabsorción de fructosa (IF), podemos encontrar la intolerancia a fructosa primaria o fructosemia, considerada un trastorno congénito hereditario en el que existe una alteración del gen aldolasa B impidiendo el correcto metabolismo a nivel hepático de alimentos que contengan fructosa, sacarosa y sorbitol, pero sin implicar una malabsorción intestinal; y la secundaria, donde se produce una alteración de la expresión o la actividad de los transportadores específicos, en concreto el GLUT-5 (Figura 18), que transporta a la fructosa por difusión pasiva y es dosis dependiente, saturando su capacidad por el exceso de fructosa, lo que generaría la sintomatología asociada (Figura 18) (Taroncher, 2019; López et al., 2020).

Actualmente, el diagnóstico “Gold standard” de la intolerancia/malabsorción de carbohidratos es el Test del aire espirado o “prueba de aliento”. Prueba no invasiva en la que se detecta la concentración de hidrógeno (H₂) y metano (CH₄) en aire exhalado tras de la ingestión y sobrecarga del carbohidrato estudiado como sustrato. Estos gases se producen en exceso por la fermentación bacteriana en el colon del carbohidrato no absorbido en intestino delgado, pudiendo producir o no la sintomatología clásica (Trelis et al., 2019; Hammer & Hammer, 2020; López et al., 2020).

El único tratamiento disponible para esta condición consiste en una dieta de exclusión a largo plazo de los carbohidratos responsables, resultando en una mejora en su estado de salud y calidad de vida (Wilder-Smith et al., 2013; Deng et al., 2015). Sin embargo, en pacientes que tras el tratamiento dietético no notan mejoría, el estudio de otras causas primarias como otras patologías intestinales o de una infección enteroparasitaria podría cambiar el abordaje de esta enfermedad. En el caso de una infección parasitaria, pasaría de considerarse una patología crónica a presentar un tratamiento específico para erradicar la parasitosis y, en consecuencia, la intolerancia/malabsorción a carbohidratos, tras la recuperación de la función intestinal (Trelis et al., 2019).

2.2. Enfermedad Celíaca

La Enfermedad Celíaca (EC) es una afección mediada por el sistema inmunitario que se caracteriza por una enteropatía intestinal crónica cuyo desencadenante es la exposición al gluten en individuos genéticamente predispuestos (Sierra et al., 2020; Lebowhl & Rubio-Tapia, 2021). La prevalencia global aproximada de esta enfermedad es del 1,4% y su incidencia ha aumentado en las últimas décadas, sin

embargo, existen multitud de casos infradiagnosticados debido a la variedad de formas de presentación de la enfermedad y de protocolos de diagnóstico (Sierra et al., 2020; Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021).

Las proteínas del gluten (presentes en el trigo, la cebada, el centeno y sus especies híbridas, y, en ocasiones, la avena) son hidrolizadas parcialmente en el intestino generando péptidos de gran tamaño capaces de atravesar la pared intestinal hasta la lámina propia donde sufren un proceso de deaminación por la enzima transglutaminasa tisular (TTG), lo que aumenta su potencial inmunogénico. Estos péptidos deaminados desencadenan una respuesta inmunitaria al unirse a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo 2, también conocidas como HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (HLA: antígenos leucocitarios humanos, por sus siglas en inglés), presentes en las células presentadoras de antígenos, complejo que será reconocido por los linfocitos T cooperadores o CD4. Además, también son capaces de generar la activación de los linfocitos T citotóxicos o CD8 (Sierra et al., 2020).

Los genes implicados en la susceptibilidad a desarrollar la EC están relacionados con la expresión de dichas moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8, encontrados en un 90% y un 5-7% en los pacientes con EC, respectivamente. Aunque también se han descrito otras variantes de riesgo como el DQ2.2, entre otras (Gozalbo et al., 2020).

Las manifestaciones clínicas de la EC pueden ser las “clásicas”, más frecuente en población infantil, que cursan con malnutrición, pérdida de peso y alteración del crecimiento, y diarrea crónica con o sin esteatorrea; y las manifestaciones “no clásicas” o atípicas, más frecuente en el adulto, que cursan con sintomatología intestinal (estreñimiento, dolor abdominal y flatulencias), y/o extraintestinal (anemia ferropénica, dermatitis herpetiforme, psoriasis, osteoporosis, artralgias o artritis, fatiga crónica, neuropatía periférica, migrañas, insuficiencia pancreática

exocrina, alteraciones hepáticas y alteraciones ginecológicas como infertilidad o endometriosis). No obstante, también es posible que no existan manifestaciones y el paciente sea asintomático, siendo diagnosticado mediante familiares de primer grado. La EC suele asociarse a otras patologías de origen autoinmunitario (diabetes mellitus, hipotiroidismo autoinmune, déficit selectivo de IgA, dermatitis herpetiforme, etc.) y cromosopatías (síndrome de Down) (Sierra et al., 2020; Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021).

El diagnóstico de esta patología se realiza mediante tres pruebas específicas: test serológico (titulación de anticuerpos IgA o IgG anti-TTG, anti-gliadina deaminada y anti-endomisio), test genético (alelos que codifican las moléculas HLA-DQ2 y DQ8, principalmente) y biopsia duodenal mediante endoscopia del tracto digestivo alto (enteropatía valorada mediante la clasificación de Marsh-Oberhuber; importante realizar un diagnóstico diferencial de otras patologías o condiciones que afecten a la misma zona) (Sierra et al., 2020; Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021). La infección por microorganismos, como virus, bacterias y parásitos, en pacientes susceptibles de desarrollar la enfermedad, podrían ejercer como desencadenante, por lo que deberían incluirse en el diagnóstico diferencial (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021).

Actualmente, el único tratamiento disponible y eficaz para la EC es la adopción de una dieta libre de gluten (DLG) controlada, evitando la presencia de trazas y asegurando el cumplimiento total del tratamiento dietético.

2.3. Síndrome del Intestino Irritable

El Síndrome del Intestino Irritable (SII), también denominado “colon irritable”, es una afección gastrointestinal funcional, caracterizada por la presencia de dolor abdominal recurrente asociado con la alteración del hábito intestinal (Cifre et al.,

2018). Se estima que el SII afecta entre el 5% y 10% de la población mundial, afectando a todos los grupos de edad (Sperber et al., 2017). Esta patología causa morbilidad, pero no mortalidad, y afecta a la calidad de vida de los pacientes (productividad, integración social, salud psicológica como ansiedad, depresión y somatización, etc.), lo que aumenta el gasto en salud pública (Ford et al., 2020).

Es posible que se presente de forma aguda tras una infección gastrointestinal, lo que se denomina SII post-infeccioso (SII-PI), en la que se dan dos o más de los siguientes síntomas: fiebre, vómitos, diarrea o un diagnóstico de heces positivo para un agente infeccioso (vírico, bacteriano o parasitario). Entre los agentes infecciosos capaces de desencadenar un SII-PI se encuentran *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. (Ghoshal & Ranjan, 2011; Poirier et al., 2012; Cifre et al., 2018; Litleskare et al., 2018; Austhof et al., 2020; Iacob et al., 2020).

La patogénesis del SII no se entiende completamente y presenta múltiples etiologías. Algunos modelos consideran que el SII es un producto de la interacción entre factores psicológicos, fisiológicos, conductuales y ambientales (Camilleri et al., 2012; Cifre et al., 2018). El enfoque tradicional se ha centrado en las alteraciones de la motilidad y la hipersensibilidad visceral (Ferreira et al., 2020; Pimentel & Lembo, 2020). Sin embargo, también se ha considerado la influencia de otros factores como la serotonina, la fructosa, una microinflamación, los parásitos intestinales, la alteración de la microbiota intestinal, y el sobrecrecimiento bacteriano, además de la conciencia alimentaria y la predisposición genética (Cifre et al., 2018; Patel & Shackelford, 2020; Pimentel & Lembo, 2020).

El diagnóstico del SII se realiza mediante los criterios basados en síntomas Roma IV, que consisten en la presencia de dolor abdominal asociado con la alteración de la consistencia de las heces o la frecuencia, con una duración de, al menos, 6 meses.

Introducción

Además, los criterios Roma IV clasifican a los pacientes según el patrón predominante de las heces, mediante el uso de la Escala de Bristol, encontrando los siguientes subgrupos: SII con diarrea, SII con estreñimiento, SII con patrones mixtos y SII no clasificado (Tabla 4) (Ford et al., 2020). Es importante realizar un diagnóstico diferencial según la sintomatología del paciente, descartando otras patologías con las que el SII podría ser confundido (Patel & Shackelford, 2020).

CLASIFICACIÓN	CRITERIOS DIAGNÓSTICOS
SII¹	Dolor abdominal recurrente, durante al menos 1 día por semana en los últimos 3 meses, asociado con dos o más de los siguientes: relacionado con la defecación: un cambio en la frecuencia de las heces, un cambio en la forma de las heces; los criterios deben cumplirse durante los últimos 3 meses, con inicio de síntomas al menos 6 meses antes del diagnóstico.
SII con Diarrea	≥25% de las deposiciones de los tipos 6 o 7 en la Escala de Bristol, y <25% de los tipos 1 o 2.
SII con Estreñimiento	≥25% de las deposiciones de los tipos 1 o 2 en la Escala de Bristol, y <25% de los tipos 6 o 7.
SII con patrón Mixto	≥25% de las deposiciones de los tipos 1 o 2 en la Escala de Bristol, y ≥25% de las deposiciones de los tipos 6 o 7.
SII no clasificado	Pacientes que cumplen con los criterios del SII, pero no se pueden clasificar en ninguno de los tres subgrupos anteriores según la Escala de Bristol.

¹SII: Síndrome del Intestino Irritable.

Debido a la amplia heterogeneidad del SII, es imposible realizar el mismo tratamiento para todos los pacientes, por lo que el manejo implica un enfoque integrado basado en una buena relación entre el paciente y el personal sanitario, educación, intervención nutricional, terapia farmacológica y psicológica, enfocado en la sintomatología predominante y su gravedad (Ferreira et al., 2020). Por lo que, para una sintomatología leve, el manejo del estrés, educación y modificaciones dietéticas (ej. dieta rica en fibra, baja en carbohidratos fermentables o FODMAPs, etc.) y de estilo de vida, y realización de ejercicio físico, pueden ser suficientes. En el

caso de sintomatología moderada, además se requiere de la identificación y modificación de los factores desencadenantes y terapia farmacológica destinada a paliar la sintomatología predominante (ej. laxantes, antidiarreicos, etc.). En cuanto a los síntomas graves se valoraría la implementación de terapia psicológica y la toma de psicofármacos (Ferreira et al., 2020; Ford et al., 2020; Patel & Shackelford, 2020). También, se han sugerido otras estrategias como la toma de probióticos, antibióticos y el trasplante fecal de microbiota, sin embargo, son necesarios más estudios que evidencien su utilidad (Canakis et al., 2020).

2.4. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) comprende la Enfermedad de Crohn (E. Cr) y la Colitis Ulcerosa (CU). Son trastornos complejos, multifactoriales e inmunomediados del tracto gastrointestinal que se caracterizan por una inflamación crónica recidivante. Si bien la etiopatogenia exacta sigue siendo desconocida, estudios recientes han implicado diferentes factores genéticos, ambientales e inmunitarios junto con la participación de la microbiota intestinal (Abraham et al., 2017). La prevalencia de la EII está aumentando a lo largo del mundo, afectando a todos los grupos de edad, pero en mayor medida a población adulta, con valores de prevalencia estimados para la E. Cr de 322/100.000 personas y para la CU 505/100.000 personas (Molodecky et al., 2012; Sairenji et al., 2017).

La E. Cr puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, abarcando desde la boca hasta el ano. La localización y la gravedad de la enfermedad se asocian a una sintomatología concreta, por lo que existe un amplio espectro de manifestaciones clínicas que suelen cursar con brotes y remisiones. La presentación más habitual de la E. Cr incluye dolor abdominal, de tipo cólico y persistente que se asocia con las

Introducción

deposiciones y se alivia tras la defecación, diarrea acuosa episódica e intermitente, que puede ser aguda o sanguinolenta en afectación de colon o rectal, y pérdida de peso, debido a la diarrea crónica, malabsorción y miedo a comer. Sin embargo, también se pueden dar síntomas más graves, entre los que se encuentran las fístulas intestinales, estenosis, fisuras y abscesos perianales, perforación, etc., o síntomas sistémicos, como la fatiga crónica y fiebre, y manifestaciones extraintestinales, como problemas dérmicos, reumáticos, renales, etc. (Flynn & Eisenstein, 2019).

La CU afecta solamente a la mucosa del intestino grueso. El grado de inflamación y afectación del colon da lugar a una amplia variedad manifestaciones clínicas que también suelen cursar con brotes y remisiones, y se mide mediante el sistema de clasificación de Montreal. El principal síntoma que se observa en la CU es la diarrea que se asocia al grado de inflamación, pudiendo ser leve, con deposiciones frecuentes de pequeño volumen y presencia de moco, o grave, e incluso llegar a pancolitis, con deposiciones líquidas y voluminosas con presencia de sangrado severo. En ocasiones es posible que se produzca una hemorragia severa e, incluso, perforación del colon y emergencias quirúrgicas. Otra sintomatología frecuente en la CU incluye tenesmos y dolor abdominal de tipo cólico pudiendo derivar en calambres severos, y, en algunos pacientes, estreñimiento con presencia de sangre y moco. Además, pueden aparecer síntomas sistémicos, como fatiga, fiebre y pérdida de peso, extraintestinales y síntomas más graves como estenosis, obstrucciones y neoplasias (Flynn & Eisenstein, 2019).

Aunque la patogenia de la EII no está clara, existen factores genéticos, ambientales y relacionados con el individuo que contribuyen al desarrollo de la inflamación intestinal. Esta parece ser debida a una desregulación del sistema inmunitario en respuesta a alteraciones en la microbiota comensal (no patógena). Los estudios

genéticos han demostrado que las interacciones hospedador-microorganismo tienen un papel destacado en la patogénesis tanto de la CU como de la E. Cr e involucran regiones genómicas que regulan la defensa microbiana y la inflamación intestinal (Wehkamp et al., 2016; Abraham et al., 2017; Sairenji et al., 2017; Flynn & Eisenstein, 2019; Lavelle & Sokol, 2020).

El diagnóstico de EII se realiza mediante el estudio de la historia clínica del paciente (antecedentes familiares, síntomas y severidad de los mismos, diagnóstico diferencial para descartar otras patologías o condiciones) y el examen físico (palpación del abdomen), valores de laboratorio (calprotectina fecal, proteína C reactiva y anticuerpos en sangre, lactoferrina en heces, etc.) y los hallazgos de los estudios endoscópicos (macroscópicos y microscópicos), histológicos y radiológicos (Wehkamp et al., 2016; Sairenji et al., 2017; Pérez de Arce et al., 2020). El método diagnóstico de referencia para la EII es la endoscopia o colonoscopia, que permite diferenciar entre la E. Cr y la CU (Sairenji et al., 2017). Estudios recientes han estudiado los perfiles metabólicos de pacientes con EII mostrando diferencias en los metabolitos generados en la E. Cr y la CU que podrían utilizarse como biomarcadores, sin embargo, son necesarios más estudios que validen este método (Lins et al., 2020).

El tratamiento de la EII tiene como objetivo minimizar la sintomatología, mejorar la calidad de vida de los pacientes y minimizar la progresión de la enfermedad y las posibles complicaciones asociadas, además de evitar futuras hospitalizaciones y cirugías (Wehkamp et al., 2016; Abraham et al., 2017). En la E. Cr los fármacos más con mejor respuesta son la budesonida y esteroides sistémicos, mientras que los aminosalicilatos son menos eficaces. En las exacerbaciones refractarias puede ser útil el empleo de anticuerpos anti-TNF- α o, más recientemente, anticuerpos anti-

integrina. En la CU, el primer fármaco de elección son los aminosalicilatos, con la adición de esteroides, antibióticos o anticuerpos anti-TNF- α o anti-integrina, si es necesario. En la terapia de mantenimiento, que se emplea para prevenir recaídas, a menudo implica inmunosupresión con tiopurinas y/o anticuerpos. Como última opción, se valora la realización de un tratamiento quirúrgico (Wehkamp et al., 2016; Abraham et al., 2017; Sairenji et al., 2017).

2.5. Gastritis crónica

La gastritis crónica es una enfermedad de larga duración muy frecuente que cursa con inflamación de la mucosa gástrica, y cuya definición se basa en las características histológicas de la misma, pudiendo aparecer cambios estructurales y producirse la pérdida de la integridad de las glándulas gástricas (Bacha et al., 2018; Crafa et al., 2018). Su clasificación se realiza en función, de las características histológicas, distribución anatómica y mecanismos patológicos subyacentes, mediante el sistema de Sydney (Crafa et al., 2018; Fang et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020). Debido a la elevada tasa de pacientes asintomáticos, es imposible conocer con certeza su prevalencia, sin embargo, se estima superior a la infección por *Helicobacter pylori* (5%), llegando al 90% en países como China, afectando en mayor medida a población adulta (Crafa et al., 2018; Fang et al., 2018)

La causa más común de gastritis crónica a nivel mundial es la bacteria *H. pylori* (70-90%), pero existen otras causas como el consumo crónico de antiinflamatorios, el tabaquismo y/o consumo de alcohol, presencia de reflujo de ácido biliar, la alteración del sistema inmunitario (gastritis autoinmune), infecciones por otros patógenos (*Mycobacterium* spp., *Herpes simplex*, *Cytomegalovirus* spp.,

Cryptosporidium spp., *Strongyloides stercoralis*, *Anisakis simplex*, etc.), radiación, E. Cr con afectación gástrica, etc. (Fang et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020).

En esta patología pueden presentarse diferentes manifestaciones clínicas como dolor epigástrico, distensión abdominal, plenitud postprandial, saciedad precoz, dispepsia, náuseas, vómitos, etc. En el caso de la gastritis autoinmune también es común la anemia perniciosa por falta de vitamina B12, con la consiguiente aparición de sintomatología neurológica. Además, la evolución de la patología puede llegar a ocasionar atrofia, úlceras gástricas y duodenales, e, incluso, neoplasias o cáncer gástrico, e incluso, pancreático y colorrectal (Fang et al., 2018; Rodríguez-Castro et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020).

La gastritis crónica es una patología multifactorial, no del todo conocida, en la que están involucrados factores infecciosos (*H. pylori*, etc.), ambientales, genéticos y psicológicos (Fang et al., 2018). La infección por *H. pylori* genera factores de virulencia que facilitan su adhesión a las células, provocan daño celular, interrumpen las uniones estrechas y permiten la evasión del sistema inmunitario, generando inflamación. Además, *H. pylori* es capaz de activar la respuesta inmunitaria del hospedador que liberará IL-8 e infiltración linfocitaria, lo que provocará daños en los tejidos e inflamación. La evolución a etapas más graves de la enfermedad no es bien conocida, aunque parece ser que factores víricos se encuentran implicados. Por otra parte, los antiinflamatorios producen la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, moléculas encargadas de los mecanismos de protección de la mucosa gástrica impidiendo lesiones por ácido clorhídrico. En la gastritis autoinmune, se hipotetiza sobre la aparición de una respuesta inmunitaria exacerbada en la que se ven afectadas las células parietales y el factor intrínseco, reduciéndose la secreción de ácido gástrico (Fang et al., 2018; Hall & Appelman, 2019; Azer & Akhondi, 2020).

Introducción

Su diagnóstico se realiza mediante la combinación de múltiples métodos: el estudio de la historia clínica y sintomatología, valores de laboratorio, gastroscopia (observación de cambios inflamatorios como erosión, eritema, sangrado, etc.) con recolección de múltiples biopsias y su posterior examen histológico y microbiológico (Bacha et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020).

El tratamiento de la gastritis crónica debe basarse en la etiología con el objetivo de mitigar la sintomatología, mejorar la reacción inflamatoria de la mucosa gástrica y mejorar la calidad de vida del paciente. Incluye modificación de la alimentación y el estilo de vida, realizando ejercicio físico y evitando bebidas excitantes, alcohol, tabaco, antiinflamatorios, etc. Algunos de los fármacos utilizados según la etiología son los inhibidores de la bomba de protones (IBP), terapia de combinación cuádruple de fármacos, con o sin bismuto (*H. pylori*), antibióticos, fármacos procinéticos (reflujo de ácidos biliares), antiácidos, protectores de mucosa, suplementos de vitamina B12 y hierro, enzimas digestivas, antidepresivos, entre otros (Fang et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020; Vicén et al., 2020).

En cualquiera de estas patologías, si el paciente no consigue una mejoría en la sintomatología y su calidad de vida tras el diagnóstico y el tratamiento pertinente e individualizado, se debe dar importancia al diagnóstico diferencial y sospechar de otras causas subyacentes que estén afectando al proceso inflamatorio evitando la remisión de la enfermedad. Podría ser el caso de una infección parasitaria crónica no diagnosticada que exacerbe las manifestaciones clínicas existentes e impida la recuperación de la mucosa gastrointestinal.

Por este motivo, en las últimas décadas múltiples equipos de investigación han centrado su interés en el estudio del papel que podrían ejercer las infecciones

parasitarias más frecuentes en el desarrollo o exacerbación de los TGC, incluido el presente estudio.

La hipótesis de la presente tesis doctoral plantea que las parasitosis intestinales crónicas no diagnosticadas podrían tener un papel importante en el desarrollo de los TGC y/o la sintomatología gastrointestinal que los caracteriza. Por este motivo, se propone determinar la presencia de parasitación con los métodos diagnósticos más eficaces en población afectada por estas patologías o con sintomatología compatible y comprobar si existe una asociación significativa. Con esto se pretende ampliar y mejorar los protocolos de diagnóstico que se emplean en la práctica clínica, cambiando el curso de las patologías, mejorando la sintomatología y, con ello, la calidad de vida de los pacientes.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral es analizar si existe una asociación entre la parasitación intestinal y los trastornos gastrointestinales crónicos (TGC) y la sintomatología, gastrointestinal y extraintestinal, que presenta la población de estudio.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la prevalencia de parasitación intestinal en los pacientes con TGC, otras patologías de interés y/o sintomatología compatible.
2. Identificar las especies parásitas más prevalentes en la población de estudio.
3. Comparar los métodos diagnósticos empleados para cada especie parásita.
4. Caracterizar la diversidad, frecuencia y variabilidad molecular de *Giardia intestinalis* en la población de estudio.
5. Caracterizar la diversidad, frecuencia y variabilidad molecular de *Blastocystis* sp.
6. Analizar la asociación de cada especie parásita con los TGC y las patologías asociadas.
7. Analizar la asociación de cada especie parásita con la sintomatología gastrointestinal y extraintestinal presente en los pacientes.
8. Identificar los posibles factores de riesgo de parasitosis en nuestro entorno.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Población objeto de estudio

Para la realización de la presente tesis doctoral se estudiaron individuos con Trastornos Gastrointestinales Crónicos que asistieron a la Clínica Universitaria de Nutrición, Actividad Física y Fisioterapia (CUNAFF) de la Fundació Lluís Alcanyis de la Universidad de Valencia desde mayo de 2016 hasta enero de 2019 para recibir un manejo personalizado que incluía un tratamiento dietoterapéutico, y, de forma adicional, se consideró pertinente realizar un diagnóstico parasitológico.

Finalmente, se incluyeron en el estudio 295 pacientes que aportaron las muestras y la información necesaria clasificándose en los siguientes grupos:

- **PARASITADOS:** constituido por 197 pacientes sintomáticos, que tras en procesado de las muestras presentaron infección por uno o más parásitos.
- **NO PARASITADOS:** constituido por 98 pacientes también sintomáticos con resultados parasitológicos negativos.

1.1.1. Criterios de inclusión

La participación en el presente proyecto requirió del cumplimiento de los siguientes criterios:

- Diagnóstico médico de patologías gastrointestinales o trastornos funcionales digestivos: Intolerancia o Malabsorción a Carbohidratos, Enfermedad Celíaca, Síndrome de Intestino Irritable, etc. Las que se consideran en este trabajo como Trastornos Gastrointestinales Crónicos o TGC.

Material y Métodos

- En caso de no presentar un diagnóstico médico previo de TGC, se valoró la presencia de sintomatología gastrointestinal (alteración del hábito intestinal (diarrea/estreñimiento), distensión abdominal, dolor abdominal, flatulencias, etc.) acompañada o no de sintomatología extraintestinal (urticarias, fatiga crónica, migrañas, etc.).
- No presentar mejoría de la sintomatología tras un tratamiento dietoterapéutico y/o farmacológico previo.
- Aceptación voluntaria de participación en el estudio y firma del consentimiento informado.

1.1.2. Criterios de exclusión

Se desestimó la participación de aquellos pacientes con tratamiento antibiótico 45 días antes del diagnóstico parasitológico. Incluyendo los siguientes fármacos: metronidazol, tinidazol, nitaxozanida, paromomicina, furazolidona o albendazol.

Además, se excluyeron aquellos pacientes que finalmente no aportaron la información pertinente para el posterior procesado de datos y la obtención de resultados.

1.2. Muestras biológicas

Durante la primera visita se hizo entrega de un kit completo de recogida de muestras de heces y saliva etiquetado con el código específico de cada paciente, junto con la explicación y las instrucciones impresas. Asimismo, se fijó la fecha y modo de entrega de las muestras en la CUNAFF.

1.2.1. Heces

Una parasitación crónica por ciertos protozoos como *G. intestinalis* presenta una baja emisión de formas de resistencia en heces por lo que realizar la recogida de una sola muestra dará lugar a una sensibilidad en las pruebas diagnósticas de aproximadamente el 40%, sin embargo, la recogida de 3 muestras obtenidas en días alternos aumenta dicha sensibilidad hasta el 85% (Trelis et al., 2019).

Para la recogida de muestras, se entregó al paciente 3 tubos estériles de 50 mL de polipropileno sin conservantes y tapón con espátula rígida (Herenz, Hamburgo, Alemania) identificados correctamente con el código de cada paciente y el orden de recogida de muestras. Durante el procedimiento de recogida el recipiente a utilizar debía estar seco y libre de contaminación, tanto de orina como de agua del inodoro. Con el fin de obtener una muestra más representativa se debían recoger materia fecal de tres localizaciones diferentes.

Cada paciente conservó las 2 primeras muestras congeladas a -20°C hasta el día de la entrega, mientras que la tercera muestra se entregó en fresco, siendo recogida el mismo día de la entrega o, en su defecto, el día anterior conservándose a 4°C hasta la entrega.

En el caso de los pacientes con vivienda fuera de la localidad, se envió un kit completo con 3 tubos REAL MiniSystem con fijador Total-Fix (Durviz, Valencia, España) que permite mantener la muestra en condiciones óptimas para el procesado y el diagnóstico molecular sin necesidad de mantener la cadena de frío.

1.2.2. Saliva

Se realizó la recogida de 3 muestras de saliva en días alternos, coincidiendo con la recogida de muestras fecales, en 3 microtubos estériles identificados con el código de cada paciente y el orden de recogida de muestra. Cada microtubo destinado a la recogida de saliva contenía 200 µL de una solución conservante compuesta por 195 µL de un cóctel de inhibidores de proteasas comercial (cOplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basilea, Suiza) al 1x en tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4) (**Tabla 5**), y 5 µL del biocida/bacteriostático ProClin 300 (Sigma-Aldrich, Misuri, USA).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (mM/L)
NaCl	137
KCl	2,7
Na ₂ HPO ₄	10
KH ₂ PO ₄	1,8
pH	7,4

La recogida se recomendó hacerla por la mañana, en ayunas y sin limpieza bucal previa. Consistió en introducir una bola de algodón estéril de 1-2 cm bajo la lengua durante 10 minutos o hasta el empapado total, y posterior introducción manual en el tubo con líquido conservante. Las muestras debían ser preservadas a 4°C hasta el día de la entrega.

2. MÉTODOS

2.1. Diseño del Estudio

Se trata de un estudio observacional, transversal y descriptivo en el que se incluyó a pacientes con TGC, con y sin diagnóstico médico, que acudían a la clínica universitaria CUNAFF para el manejo de sus problemas gastrointestinales mediante tratamiento dietoterapéutico y, en la búsqueda del origen de sus trastornos, se les realizó un análisis completo de los parásitos intestinales más frecuentes en nuestro entorno.

El estudio se realizó en un periodo de 3 años, comenzando el proceso de inclusión de pacientes y recogida de muestras en mayo de 2016, y finalizándolo en marzo de 2019.

El plan de trabajo seguido durante el estudio y las intervenciones planteadas se han resumido en el esquema que se puede observar en la Figura 19. En este se muestra el flujo de información, las muestras biológicas recogidas y los procedimientos de diagnóstico parasitológico realizados a cada uno de los pacientes. En los siguientes apartados de la presente tesis doctoral se realiza una descripción detallada de cada procedimiento.

La entrevista individualizada a cada paciente, la entrega de la información y el material destinado a la recogida de muestras, así como la entrega de las muestras por el paciente se realizó en la clínica universitaria CUNAFF, en la que fue imprescindible la colaboración de la Dra. Taroncher.

El procesado de las muestras biológicas y el diagnóstico parasitológico lo realizó la doctoranda bajo la supervisión y ayuda de las Dras. Trelis y Gozalbo, en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València.

Tras el diagnóstico parasitológico se emitía un documento informativo dirigido al paciente en el que se anunciaba el resultado (Anexo 1). En caso de obtener un diagnóstico positivo, se recomendaba acudir a su médico para que se les pautara, en caso de que se considerase necesario, el tratamiento adecuado para cada especie parásita. Dos meses tras el tratamiento farmacológico se realizaba la reevaluación parasitológica para obtener información acerca de la eficacia del tratamiento pautado. En caso de que la parasitación persistiera, se repetía el tratamiento farmacológico y se evaluaba de nuevo al paciente hasta la confirmación de la eliminación de los mismos.

Como complemento a las pruebas diagnósticas, y como colaboradoras en un estudio de epidemiología molecular de protozoosis humanas a nivel nacional, las muestras de heces positivas en los análisis moleculares fueron enviadas al Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) para la identificación y caracterización de las especies, los genotipos, los subgenotipos y los subtipos por parte de la doctoranda con la ayuda y supervisión del Dr. David Carmena.

2.1.1. Recogida de datos

Para la recogida de datos se realizó una entrevista individual en la cual se explicó detalladamente el estudio (documento de información al paciente) y las condiciones de participación (voluntaria y anónima). Por último, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los participantes.

Durante la entrevista se cumplimentó un cuestionario (Anexo 2) con el que se recopilaba la siguiente información:

- **Datos sociodemográficos:**

Nacionalidad, edad, sexo, lugar de residencia, información de contacto etc.

- **Datos clínicos:**

1. Antecedentes de enfermedad intestinal o extraintestinal (propia o familiar) (Tabla 6) y pruebas diagnósticas previas relacionadas (analíticas sanguíneas, endoscopias, biopsias, test de hidrógeno espirado, etc.).
2. Sintomatología intestinal como dolor y/o distensión abdominal, flatulencias/meteorismo/borborigmos, frecuencia de las deposiciones, forma y consistencia de las heces, reflujo, ardor, dispepsia, etc.
3. Sintomatología extraintestinal como urticarias, picores, fatiga crónica, dolor articular, etc.
4. Otras patologías consideradas de interés (Tabla 6).
5. Tratamientos farmacológicos y suplementos habituales, crónicos y/u ocasionales.
6. Modificaciones nutricionales previas y percepción del grado de mejora.

Tabla 6. Patologías de interés en la población de estudio
Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)
Intolerancia/Malabsorción a carbohidratos
Lactosa
Fructosa
Síndrome de Intestino Irritable
Enfermedad Celíaca
Enfermedad Inflamatoria Intestinal
Enfermedad de Crohn
Colitis Ulcerosa
Gastritis crónica
Otras patologías gastrointestinales
Sobrecrecimiento bacteriano
<i>Helicobacter pylori</i>
Otras patologías (esófago de Barret, esofagitis eosinofílica, hernia hiato, otras gastritis, pólipos, adenomas y/o úlceras gastrointestinales, duodenitis, bulbitis duodenal, ileítis, colitis, intolerancia a sorbitol, déficit de diamino oxidasa (DAO), estenosis, obstrucción intestinal, hiperplasia linfoidea, linfangiectasia intestinal, hemorroides, hepatitis, poliquistosis hepática, Síndrome de Gilbert, etc.)
Enfermedades extraintestinales
Otras enfermedades autoinmunes (diabetes mellitus Tipo 1, lupus eritematoso sistémico, Corea de Huntington autoinmune, espondilitis anquilosante, endometriosis, hipotiroidismo de Hashimoto, enf. de Graves-Basedow, psoriasis, polimialgia reumática, hepatitis autoinmune, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, Síndrome de Reynolds, enf. de Addison, artritis reumatoide, vitíligo).
Alergias

- **Datos epidemiológicos de riesgo de parasitosis intestinales:**

Profesión, contacto de niños/niñas y/o personas discapacitadas, viajes recientes a países tropicales, contacto con animales, consumo de frutas y verduras frescas de cultivo ecológico, consumo de agua no embotellada procedentes de fuentes o manantiales, tratamiento crónico con omeprazol y antecedentes de parasitosis.

2.2. Herramientas utilizadas para la obtención de datos clínicos

Cierta sintomatología intestinal es difícil de valorar mediante una entrevista clínica, para facilitar la obtención de la información, se contó con ciertas herramientas validadas y de uso habitual en la consulta clínica como la Escala Visual Analógica (EVA) para la valoración de algunos síntomas gastrointestinales y la Escala de Bristol para la descripción de las heces.

2.2.1. Escala Visual Analógica (EVA)

Esta herramienta fue utilizada por primera vez por Hayes y Patterson en 1921 (Delgado et al., 2018) y permite al paciente valorar de forma sencilla la intensidad de la sintomatología en diferentes niveles (leve, moderado e intenso o severo). Los niveles de intensidad se asocian a valores numéricos del 0 al 10, considerando una intensidad “Leve” cuando el paciente valora el síntoma entre el 0 y 2, “Moderado” entre 3 y 7 e “Intenso o Severo” entre 8 y 10 (Figura 20).



Figura 20. Escala visual Analógica (EVA).

Fuente: Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, 2018.

Se trata, por tanto, de una herramienta que valora de forma subjetiva la intensidad de los síntomas del paciente, pero que realizada a lo largo de la intervención terapéutica resulta útil para estudiar la evolución de los síntomas y la eficacia de los métodos empleados.

2.2.2. Escala de Bristol

La Escala de Bristol fue desarrollada por Heaton y Lewis en 1997 (Lewis et al., 1997) para permitir al paciente clasificar de forma visual sus heces en 7 tipos diferentes como se puede observar en la Figura 21. El empleo de esta escala aporta información respecto a la forma y consistencia de las heces, lo que permite al investigador o personal clínico conocer y valorar el tiempo de tránsito intestinal y la posible presencia de síndromes de malabsorción.

Tipo 1		Heces en forma de bolas duras y separadas que pasan con dificultad
Tipo 2		Heces en forma de salchicha compuesta por fragmentos
Tipo 3		Heces con forma de salchicha con grietas en la superficie
Tipo 4		Heces como una salchicha o serpiente, lisa y suave
Tipo 5		Bolas blandas con los bordes definidos, que son defecados fácilmente
Tipo 6		Trozos blandos y esponjosos, con bordes irregulares y consistencia pastosa
Tipo 7		Acuosa, sin trozos sólidos, totalmente líquida

Figura 21. Escala de Bristol desarrollada por Lewis Heaton y Heaton en 1997.

Fuente: <https://cienciatoday.com/wp-content/uploads/2017/12/escala-bristol-2.jpg>.

2.3. Análisis parasitológico de muestras fecales

2.3.1. Concentrado de las muestras

El primer paso para proceder al análisis de las muestras fecales fue el de la concentración y filtrado de las mismas mediante centrifugación con el sistema de extracción de doble filtro y fondo cónico para el diagnóstico parasitológico de Midi Parasep Solvent Free de 50mL (Apacor, Wokingham, UK) (Figura 22), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema es de fácil manipulación y no requiere de disolventes orgánicos tóxicos, como el éter y acetato de etilo, utilizados en las técnicas tradicionales (Tenorio-Abreu et al., 2013).

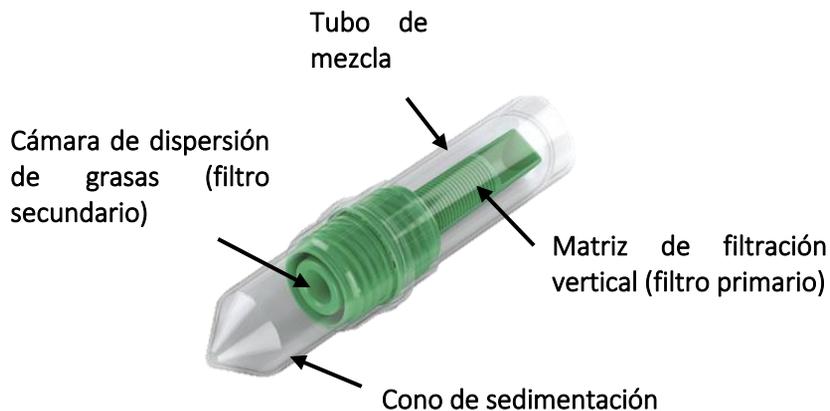


Figura 22. Sistema de concentración y filtración por centrifugación para el diagnóstico parasitológico Midi Parasep SF.

Fuente: www.monlab.es/index.php/sifilis/rpr/56-productos/microbiologia.html

El procedimiento comienza con la mezcla de 2 g de heces con 8 mL de solución salina 0,9% esterilizada en el tubo de mezcla y homogeneizado con una varilla de madera. Tras la homogeneización manual se aplican 10-15 segundos de vórtex (MS1 Minishaker, IKA, Breisgau, Alemania). Una vez bien mezclado, se monta sobre el tubo de mezcla el sistema de filtros y sedimentación Parasep siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 23). Por último, para forzar el paso de las heces a través de los filtros, se centrifugan los tubos orientando el fondo cónico hacia abajo a 2.500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Tras la centrifugación, se descarta el sobrenadante y con el precipitado formado en la punta del cono de sedimentación se continúa el procesado y análisis.



Figura 23. Procesado de muestras de heces mediante el sistema Parasep.

En este caso, se realizaron dos alícuotas del concentrado de cada muestra en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Una de ellas, de aproximadamente 200 mg, se destinó al análisis molecular y conservó, sin añadir ningún conservante, a -80°C hasta su utilización. La parte restante del concentrado se fijó con formalina al 10% (Sigma-Aldrich, Misuri, USA) manteniendo una relación de heces/formalina de 1:3 para fijarlas y conservarlas hasta su observación al

microscopio asegurando la adecuada preservación de las posibles formas parásitas presentes en la muestra.

2.3.2. Microscopía óptica

El análisis de muestras fecales mediante microscopía óptica es la técnica más utilizada para el diagnóstico etiológico de parásitos en heces, permitiendo identificar de forma rápida, sencilla y económica todos los parásitos que puedan estar presentes en dichas muestras. Sin embargo, la sensibilidad de del diagnóstico coprológico dependerá del uso de métodos de concentración, de la disposición de tiempo y la disponibilidad de personal cualificado para la correcta visualización e identificación de las diferentes estructuras parasitarias (trofozoítos, quistes, ooquistes, esporas, huevos, larvas y adultos) (Hooshyar et al., 2019). La mayoría de las estructuras parasitarias presentes en heces son formas de resistencia de los parásitos: quistes u ooquistes de protozoos, y huevos o larvas de helmintos. Sin embargo, esta técnica también permite visualizar otras formas parasitarias como, por ejemplo, los trofozoítos de *Giardia intestinalis* o *Entamoeba histolytica/dispar* y las diferentes formas de *Blastocystis* sp.

Para el diagnóstico coproparasitológico se empleó un microscopio Nikon® ECLIPSE E100-LED (Melville, USA) (Figura 24) con doble ocular de 10x aumentos y un revólver de 4 objetivos de diferentes aumentos: 4x, 10x, 40x y 100x (objetivo de aceite de inmersión), utilizando el objetivo de 4x para el enfoque de la muestra, el de 10x para la búsqueda rápida de huevos de helmintos, y el de 40x para la identificación de las formas protozoarias y helmínticas.



Figura 24. Microscopio óptico Nikon ECLIPSE E100-LED.

Fuente: www.microscope.healthcare.nikon.com/es_AMS/products/upright-microscopes/eclipse-e100

La preparación de la muestra fecal se realizó en un portaobjetos donde se colocó, mediante una pipeta Pasteur de cristal una pequeña gota de la muestra fecal conservada en formalina 10% correctamente homogeneizada mediante vórtex para asegurar la resuspensión de las formas parásitas. A dicha gota se le añadió otra gota de solución salina esterilizada al 0,9% y se homogeneizó con ayuda de un cubreobjetos, que posteriormente se posó con cuidado sobre la mezcla. Para asegurar el correcto diagnóstico, se visualizaron 4 gotas de cada muestra. De forma complementaria, se tiñó una de las gotas con solución de Lugol para ayudar en la identificación de los quistes y trofozoítos de los unicelulares mediante el tamaño, la morfología y las características de la cubierta exterior y del/los núcleo/s, y los huevos de helminto mediante morfología y tamaño.

2.3.3. Análisis parasitológico molecular

La coprología parasitaria mediante microscopía óptica presenta ciertas limitaciones para el diagnóstico parasitario, entre ellas se requiere de personal cualificado, presenta una baja sensibilidad dando lugar a elevadas tasas de falsos negativos y no permite la caracterización morfológica de ciertas subespecies o genotipos/subtipos (Dacal et al., 2020). Se suma a lo anteriormente expuesto el que con la cronificación de las parasitosis intestinales se controla la carga parasitaria y la emisión de formas de resistencia al exterior se torna intermitente (Trelis et al., 2019). Por todo ello, como complemento a la microscopía se optó por implementar técnicas de análisis molecular para el diagnóstico de las especies parásitas más frecuentes, como *Giardia intestinalis* y *Blastocystis sp.*, y cuyo diagnóstico conlleva inconvenientes.

2.3.3.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA total del concentrado de heces destinado al análisis molecular se realizó mediante el Kit comercial “QIAamp FAST DNA STOOL MINI KIT” de QIAGEN (Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo manual indicado por el fabricante con algunas modificaciones.

El procedimiento empleado es el siguiente: en primer lugar, se descongela la alícuota de 200 mg del concentrado de heces conservada a -80°C y se añade 750 µL de tampón o *buffer* Inhibitex (elimina eficientemente los inhibidores de PCR comúnmente presentes en este tipo de muestras). Posteriormente, se homogeneiza la mezcla durante 1 minuto mediante el agitador vórtex.

El siguiente paso consiste en calentar las muestras a 95 °C, en agitación (300 rpm), durante 10 minutos mediante un sistema de calentamiento a temperatura

controlada (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Tras el calentamiento se deja atemperar la muestra, se aplica de nuevo el vórtex durante 15 segundos y se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 minutos (MiniSpin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). En este caso, se conserva el sobrenadante y se descarta el precipitado.

En un nuevo microtubo se pipetea 15 μL de Proteinasa K (enzima encargada de romper/degradar proteínas) y se añade 200 μL del sobrenadante del paso anterior, asegurando la homogeneización tras agitar con el vórtex durante 15 segundos. Seguidamente, se añade 200 μL de *buffer* AL o tampón de lisis (rompe las membranas plasmática y nuclear), y se aplica 15 segundos de vórtex.

Para continuar con la extracción, se incuban las muestras a 55 °C durante 90 minutos y agitación constante (300 rpm). Pasado este tiempo se aumenta la temperatura a 70 °C durante 10 minutos adicionales y, tras ello, se aplica un método adicional de lisis por sonicado durante 30 minutos (Elmasonic S, Elma, Singen, Alemania). A continuación, se agregan 200 μL de etanol absoluto para provocar la precipitación del DNA y se homogeneiza mediante vórtex.

En una última fase de la extracción y tras montar una columna QIAamp sobre un tubo colector de 2 mL, se pasa 600 μL del lisado anterior y se centrifuga (13.000 rpm; 3 minutos); se descarta el filtrado y se coloca la columna en un nuevo tubo colector. Se añade 500 μL de *buffer* AW1 o primer tampón de lavado y se vuelve a centrifugar (13.000 rpm; 1 minuto) descartando el filtrado y colocando la columna en otro tubo de 2mL. Se añade un segundo tampón de lavado o *buffer* AW2 (500 μL) y se centrifuga (13.000 rpm; 3 minutos) descartándose el filtrado y colocando la columna en un nuevo tubo. Para el secado de la columna se aplica un último centrifugado sin la adición de ningún reactivo (13.000 rpm; 3 minutos).

Material y Métodos

Una vez seca la columna que retiene el DNA, se transfiere a un microtubo de 1,5 mL, y se añade 100 μ L de *buffer* ATE o tampón de elución directamente sobre la membrana de la columna. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos se centrifuga durante 1 minuto para conseguir la total elución del DNA. Los microtubos con el DNA total extraído de cada muestra se conservarán a -20°C hasta su uso para el análisis molecular.

2.3.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real

2.3.3.2.1. Detección molecular de *G. intestinalis*

El diagnóstico molecular de *G. intestinalis* se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR), método elegido debido a su elevada sensibilidad, sencillo manejo y rapidez (Dacal et al., 2020).

El marcador génico que se utilizó para la detección de *Giardia* fue un fragmento específico de 62 pb (pares de bases) del gen que codifica el ácido ribonucleico ribosómico de la Subunidad Pequeña Ribosomal 18S (*SSU rRNA*, por sus siglas en inglés). Se eligió este gen debido a que el genoma presenta múltiples copias lo que favorece la amplificación durante el análisis y aumenta la sensibilidad de la técnica diagnóstica (Verweij et al., 2003; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Reh et al., 2019).

La preparación de la mezcla de reacción o *Master mix* se llevó a cabo en placas de reacción óptica de 96 pocillos MicroAmptrade (Applied Biosystems). En la Tabla 7 se muestran los reactivos y volúmenes necesarios para la preparación de cada reacción con un volumen final de 20 μ L. En cada placa de qPCR se incluyó, además de las muestras, un control negativo (agua grado-PCR) y un control positivo (DNA control de *G. intestinalis*).

Tabla 7. Reactivos y cantidades empleadas en la qPCR de *G. intestinalis*

REACTIVOS	REACCIÓN 1x
DNA de la muestra o molde	5 µL
Cebadores + Sonda de hidrólisis marcadas con FAM (LightMix Modular <i>Giardia</i> ¹)	0,5 µL
<i>Master mix</i> PerfeCTa qPCR ToughMix ²	10 µL
Agua ultrapura (grado-PCR)	4,5 µL
VOLUMEN TOTAL	20 µL

¹TIB Molbiol (Berlín, Alemania); ²Quantabio (Beverly, USA)

Previa a la preparación de la mezcla de reacción se requirió la reconstitución del reactivo liofilizado LightMix Modular *Giardia* (cebadores y sonda de hidrólisis específicos). Se reconstituyó mediante la adición de 50 µL de agua grado-PCR, una agitación con vórtex y, finalmente, un centrifugado rápido o *spin down*. Una vez reconstituido debe conservarse en total oscuridad para asegurar la funcionalidad de la sonda de hidrólisis en las próximas qPCR.

Los cebadores o primers específicos de *G. intestinalis* son secuencias cortas de oligonucleótidos complementarios a las cadenas del fragmento de DNA diana escogido, siendo el cebador *Forward* (F) el que se une a la cadena molde y el cebador *Reverse* (R) a la cadena complementaria actuando como señalizadores de la zona concreta del DNA total que la enzima DNA Taq polimerasa debe amplificar (Figura 25).

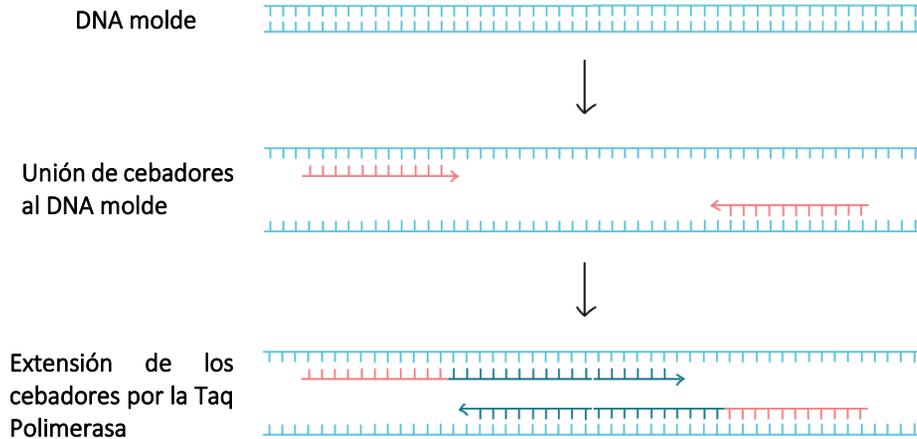


Figura 25. Esquema del fundamento de la PCR.

Fuente: adaptado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.

Por otra parte, la mezcla de reacción o *Master mix* es el reactivo encargado de aportar el enzima encargado de la amplificación, la DNA polimerasa termoestable (AccuStart II Taq DNA Polymerase (Quantabio Beverly, USA)) encargada de realizar las copias del DNA molde y aportar el medio de reacción idóneo ($MgCl_2$, desoxirribonucleótidos o dNTPs, tampones de pH, neutralizadores de inhibidores, etc.).

Las reacciones se realizaron en el termociclador para qPCR StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) vinculado al software StepOne versión 2.3., siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y que se describe a continuación (Figura 26):

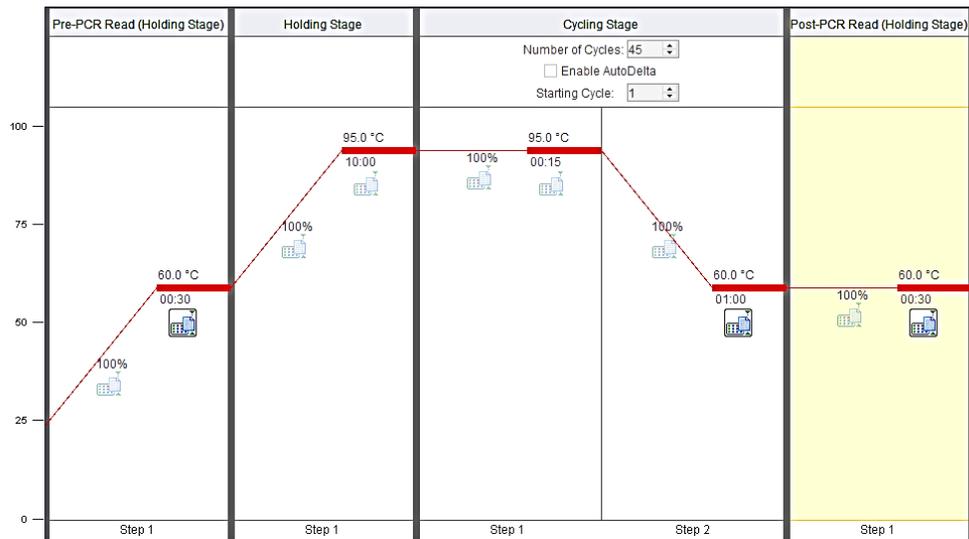


Figura 26. Ciclos y condiciones del Sistema StepOnePlus para detección de *G. intestinalis* mediante qPCR.

- Paso previo de 30 segundos a 60 °C (calentamiento).
- Paso inicial de 10 minutos a 95 °C (desnaturalización de la doble hélice del DNA y activación de la DNA polimerasa).
- 45 ciclos de amplificación: 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minuto a 60 °C (hibridación o unión de los cebadores al DNA molde y elongación o amplificación del DNA por la Taq polimerasa haciendo uso de los dNTPs del medio) (Figura 27).
- Paso final de 30 segundos a 60 °C (elongación final).

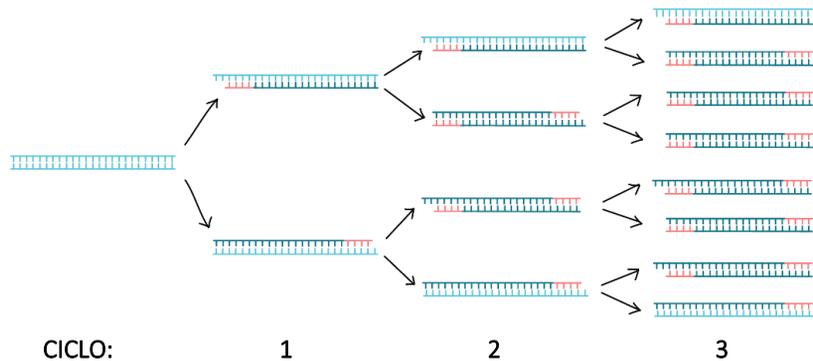


Figura 27. Síntesis de DNA en cada ciclo de amplificación de la PCR.

Fuente: adaptado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotechnology-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

El DNA diana amplificado en cada ciclo se detecta midiendo la fluorescencia emitida por la sonda de hidrólisis TaqMan marcada con el fluoróforo FAM (530) en el extremo 5', cuando al hibridar la sonda con el DNA formado se libera del inhibidor de fluorescencia o quencher TAMRA que marcaba el extremo 3' de dicha sonda.

Al finalizar la reacción, el programa informático StepOne v2.3. proporcionó una representación gráfica de la amplificación del fragmento diana en cada muestra, revelando la presencia del DNA del parásito cuando la fluorescencia detectada supera el umbral de positividad o threshold, calculado automáticamente a partir de los controles. Además, el software permite cuantificar de forma relativa el DNA amplificado (ΔR_n) en función de los valores de Ct (Ciclo umbral o Threshold cycle), siendo el Ct la intersección entre la curva de amplificación de cada muestra de DNA y la línea umbral o threshold (Figura 28). Se consideraron positivas aquellas muestras con un valor de Ct inferior o igual a 43, tal como indica el fabricante, siendo óptimos los valores de Ct entre 20 y 35.

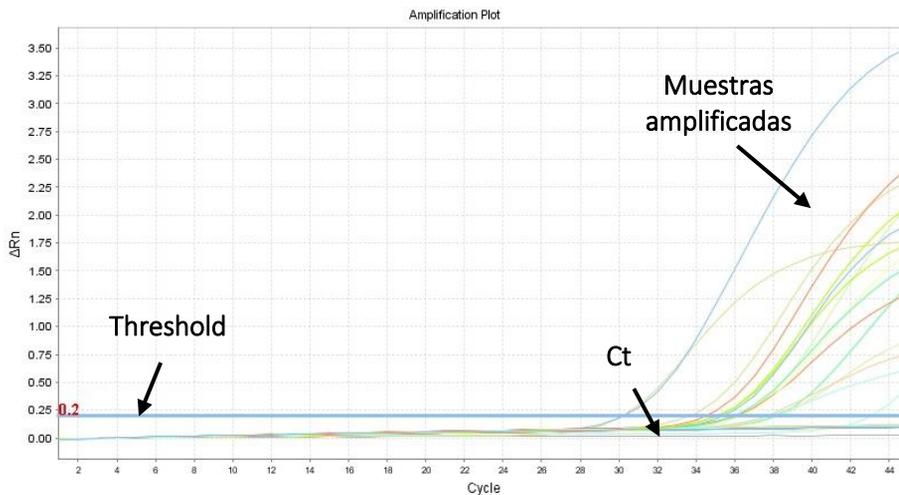


Figura 28. Gráfica de amplificación (ΔRn vs. ciclo) mostrando la detección de *G. intestinalis* en la qPCR.

2.3.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final o convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final o convencional difiere de la qPCR en que la detección del fragmento diana amplificado se realiza tras la finalización de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.3.3.4.), no mediante la lectura de fluorescencia a tiempo real.

2.3.3.3.1. Caracterización molecular de *G. intestinalis*

Las muestras de DNA que fueron positivas para *G. intestinalis* mediante la qPCR se analizaron posteriormente mediante PCR convencional utilizando los dos marcadores moleculares que más frecuentemente se emplean en los estudios de caracterización molecular para el genotipado y subgenotipado de *Giardia*. Los genes diana para el estudio molecular fueron:

Material y Métodos

a) *Glutamato deshidrogenasa (gdh)*:

El gen que codifica la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) es uno de los marcadores genéticos más populares y útiles para el análisis genotípico de *G. intestinalis*. La *gdh* es un enzima con actividad oxidorreductasa que participa en el metabolismo de los aminoácidos celulares. Según los datos genéticos del gen de la *gdh*, existe un nivel sustancial de diversidad genética en esta especie a este nivel lo que permite diferenciar los distintos genotipos de la especie.

La amplificación de un fragmento de 432 pb del gen *gdh* (Tabla 8) se realizó mediante una PCR semianidada desarrollada por Read y colaboradores (2004) con mínimas modificaciones. Se empleó dicha PCR debido su buen rendimiento en múltiples estudios en cuanto a sensibilidad y amplificación (Read et al., 2004; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Reh et al., 2019).

Tabla 8. Secuencia completa del gen *gdh* de *G. intestinalis*

```
CAGTACAACCTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCACCCCTGTCAATCTTT  
CGATTCTCAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCGATGG  
GCGGCGGCAAGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCG  
CTTCTGCCAGTCTTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGCGCCGACACTGACGTTCTGC  
CGGCGACATCGGCGTCGGCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTG  
AGGAACGAGTTCACAGGCGTCCTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCCTTCATCA  
GGCCGGAGGCTACGGGCTATGGCGCTGTCTACTTCTGGAGGAGATGTGCAAGGACAAC
```

La PCR semianidada consiste en realizar dos PCR convencionales consecutivas, cambiando o combinando los cebadores en cada una de ellas. En este caso, se utilizó el mismo cebador *Reverse* (R) en ambas PCR, y se modificó el cebador *Forward* (F), utilizando un *F.* externo en la primera PCR (directa), y un *F.* interno en la segunda PCR (semianidada). Además, en la PCR semianidada se utiliza como DNA molde el producto amplificado (amplicón) de la primera PCR directa.

En la Tabla 9 se muestran las secuencias de los cebadores (Invitrogen, California, USA) utilizados en cada paso, diseñados por Read y colaboradores (2004) con bases degeneradas para permitir la amplificación de todos los genotipos del parásito.

PCR	CEBADOR	SECUENCIA
PCR 1	<i>F</i> externo – GDHeF	5'–TCAACGYAAYCGYGGYTTCCGT–3'
	<i>R</i> – GDHiR	5'–GTTRTCCTGCACATCTCC–3'
PCR 2	<i>F</i> interno – GDHiF	5'–CAGTACAACCTCYGCTCTCGG–3'
	<i>R</i> – GDHiR	5'–GTTRTCCTGCACATCTCC–3'

La mezcla de reacción se preparó en microtubos estériles de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). En la Tabla 10 se pueden consultar los reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción, en ambas para un volumen final de 25 µL. En cada PCR se incluyó, además de las muestras, un control negativo (agua grado-PCR) y un control positivo (DNA control de *G. intestinalis*).

MIX PCR DIRECTA	1x	MIX PCR SEMIANIDADA	1x
DNA molde	5 µL	Amplicón de la PCR DIRECTA	5 µL
5x MyTaq reaction Buffer ¹	5 µL	5x MyTaq reaction Buffer ¹	5 µL
10 µM GDHe_F (500 nM) ²	1,25 µL	10 µM GDHi_F (500 nM) ²	1,25 µL
10 µM GDHi_R (500 nM) ²	1,25 µL	10 µM GDHi_R (500 nM) ²	1,25 µL
MyTaq (5U/µl) (2,5 U) ¹	0,5 µL	MyTaq® (5U/µl) (2,5 U) ¹	0,5 µL
dNTPs Mix (10mM) ³	0,5 µL	dNTPs Mix (10mM) ³	0,5 µL
Agua ultrapura (grado-PCR)	11,5 µL	Agua ultrapura (grado-PCR)	11,5 µL
VOLUMEN TOTAL	25 µL	VOLUMEN TOTAL	25 µL

¹Bioline (Luckenwalde, Alemania), ^{2,3}Invitrogen (California, USA).

Material y Métodos

Para la preparación de la mezcla de reacción, ya sea directa, anidada o semianidada, debe tenerse en cuenta que la DNA Polimerasa, en este caso MyTaq (Bioline, Luckenwalde, Alemania), debe conservarse a -20 °C hasta el momento del uso, y guardar rápidamente para que mantenga su función. En este caso, la solución tampón específica para el enzima empleado, MyTaq reaction Buffer (Bioline, Luckenwalde, Alemania), es el encargado de proporcionar el medio adecuado para que se produzca la reacción (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, estabilizadores y potenciadores, etc.).

El protocolo de amplificación se realizó con el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA) con las mismas condiciones de reacción para ambas PCR, tal como se indica en la Tabla 11.

TEMPERATURA (T ^º)	TIEMPO	
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	35 ciclos
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

b) *β-Giardina (bg)*:

En el caso del gen de la *β-giardina (bg)*, proteína estructural de membrana específica del parásito, se amplificó una secuencia parcial de 511 pb mediante una PCR anidada desarrollada por Cacciò (2002) y Lalle (2005) y colaboradores con mínimas modificaciones.

La PCR anidada es similar a la PCR semianidada descrita anteriormente, pero utiliza dos parejas de cebadores diferentes en cada PCR, en este caso, en la primera PCR o

directa se utilizan dos cebadores externos *Forward* (G7_F) y *Reverse* (G759_R) que amplifican un fragmento de 753 pb, y en la segunda PCR o anidada, se utilizan dos cebadores internos *Forward* (G99_F) y *Reverse* (G609_R), junto con el producto de la PCR anterior como DNA molde, para obtener finalmente el fragmento diana de 511 pb. En la Tabla 12 se pueden observar las secuencias de los cebadores utilizados.

Tabla 12. Cebadores específicos para el gen *bg* de *G. intestinalis* (Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005)

PCR	CEBADOR	SECUENCIA
PCR 1	F externo – G7_F	5'–AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC–3'
	R externo – G759_R	5'–GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC–3'
PCR 2	F interno – G99_F	5'–GAACGAACGAGATCGAGGTCCG–3'
	R interno – G609_R	5'–CTCGACGAGCTTCGTGTT–3

La mezcla de reacción se preparó de forma similar a la del gen anterior *gdh*. En la Tabla 13 se muestran los reactivos y volúmenes que se utilizaron en ambas PCR hasta conseguir el volumen final de 25 µL para cada muestra. En ambas PCR se incluyó un control negativo (agua grado-PCR) y un control positivo (DNA control).

Tabla 13. Mix de reacción para la PCR anidada del gen *bg* de *G. intestinalis*

MIX PCR DIRECTA	1x	MIX PCR ANIDADA	1x
DNA molde	5 µL	Amplicón de la PCR DIRECTA	3 µL
5x MyTaq reaction Buffer ¹	5 µL	5x MyTaq reaction Buffer ¹	5 µL
10 µM G7_F (200 nM) ²	1 µL	10 µM G99_F (200 nM) ²	1 µL
10 µM G759_R (200 nM) ²	1 µL	10 µM G609_R (200 nM) ²	1 µL
MyTaq® (5 U/µl) (2,5U) ¹	0,5 µL	MyTaq® (5 U/µl) (2,5U) ¹	0,5 µL
dNTPs Mix (10 mM) ³	0,5 µL	dNTPs Mix (10 mM) ³	0,5 µL
Agua ultrapura (grado-PCR)	12 µL	Agua ultrapura (grado-PCR)	14 µL
VOLUMEN TOTAL	25 µL	VOLUMEN TOTAL	25 µL

¹Bioline (Luckenwalde, Alemania), ^{2,3}Invitrogen™ (California, USA).

Material y Métodos

El protocolo de amplificación se realizó en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad®, California, USA) con condiciones específicas diferentes para la PCR directa y la PCR anidada como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones de PCR para amplificación del gen *bg* (Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005)

PCR DIRECTA			PCR ANIDADA		
TEMPERATURA (Tª)	TIEMPO		TEMPERATURA (Tª)	TIEMPO	
95 °C	7 min		95 °C	7 min	
95 °C	30 s	35 ciclos	95 °C	30 s	35 ciclos
65 °C	30 s		55 °C	30 s	
72 °C	1 min		72 °C	1 min	
72 °C	7 min		72 °C	7 min	
4 °C	∞		4 °C	∞	

Los productos de amplificación o amplicones obtenidos al finalizar las PCR de ambos genes se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

2.3.3.3.1. Caracterización molecular de Blastocystis sp.

La detección de *Blastocystis* sp. se llevó a cabo mediante una PCR directa para la amplificación de un fragmento diana de 600 pb del gen *SSU rRNA*, una región muy conservada en el genoma de los diferentes subtipos del parásito que permite la diferenciación del resto de organismos del sistema intestinal (Scicluna et al., 2006).

El protocolo que se siguió fue desarrollado por Scicluna y colaboradores (2006), al igual que los cebadores específicos utilizados (RD5 y BhrDR), cuya secuencia se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Cebadores específicos para el gen *SSU rRNA* de *Blastocystis* sp. (Scicluna et al., 2006)

CEBADOR	SECUENCIA
<i>Forward</i> – RD5	5'–ATCTGGTTGATCCTGCCAGT–3'
<i>Reverse</i> – BhrDr	5'–GAGCTTTTTAACTGCAACAACG–3'

La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL, conteniendo las cantidades indicadas de los reactivos detallados en la Tabla 16. En cada reacción se incluyó un control negativo (agua grado-PCR) y un control positivo (DNA control de *Blastocystis*).

Tabla 16. Mezcla de reacción para la PCR de *Blastocystis* sp. (Scicluna et al., 2006)

REACTIVOS	REACCIÓN 1x
DNA molde	5 µL
5x MyTaq reaction Buffer ¹	5 µL
10 µM RD5 (500 nM) ²	1,25 µL
10 µM BhrDr (500 nM) ²	1,25 µL
MyTaq (5 U/µl) (2,5U) ¹	0,5 µL
dNTPs Mix (10 mM) ³	0,5 µL
Agua ultrapura (grado-PCR)	11,5 µL
VOLUMEN TOTAL	25 µL

¹Bioline (Luckenwalde, Alemania), ^{2,3}Invitrogen (California, USA).

El termociclador utilizado para la realización del protocolo de amplificación se fue el C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA) con las condiciones de reacción que se muestran en la Tabla 17.

Los productos de amplificación o amplicones obtenidos al finalizar las PCR de ambos genes se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

Tabla 17. Condiciones de PCR para amplificación del gen SSU de *Blastocystis* (Sciicluna et al., 2006)

TEMPERATURA (Tª)	TIEMPO	
95 °C	3 min	
94 °C	1 min	35 ciclos
59 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

2.3.3.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos en las PCR de punto final de *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa para valorar visualmente si la amplificación de las muestras se había llevado a cabo siguiendo la metodología modificada de Sambrook y colaboradores (1989).

La electroforesis permite separar los fragmentos de DNA amplificados en el gel de agarosa al 2% en función del tamaño y de la carga de cada uno de ellos mediante la aplicación de una corriente eléctrica determinada.

La preparación del gel de agarosa al 2% con un volumen final de 100 mL se realizó disolviendo mediante calor 2 g de agarosa en polvo Certified Genetic Quality Tested (GQT) DNA Grade Agarose (Bio-Rad, California, USA) en 100 mL de solución tampón TAE (1x) (50x TAE Buffer (Tris-acetato-EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)), tras esperar a que la mezcla quede tibia, se añadieron 5 µL de SafeView (NBS Biologicals, Huntingdon, UK), pigmento libre de bromuro de etidio que se intercala entre las bases del DNA durante la técnica y genera fluorescencia en presencia de luz ultravioleta (UV). Finalmente, se dejó solidificar en el sistema

Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, California, USA) compuesto de moldes y peines que darán forma al gel y a los pocillos que posteriormente albergarán las muestras.

La técnica se realizó en una cubeta de electroforesis para DNA Mini-sub Cell GT Cell (Bio-Rad, California, USA) (Figura 29) conectada a una fuente PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, California, USA) encargada de generar la corriente continua. El gel de agarosa solidificado debe sumergirse totalmente en la cubeta con la solución tampón TAE (1x) conductora, de tal forma que, al aplicar una corriente de 60 voltios durante 30 minutos, las muestras se desplacen o corran desde el cátodo (carga negativa) hacia el ánodo (carga positiva) permitiendo que los fragmentos de DNA de los amplicones, que presentan carga negativa, se desplacen por el gel a diferentes velocidades según el tamaño o pares de bases, separándolos, ya que los más pequeños se desplazarán a mayor velocidad sobre el gel que los más grandes.

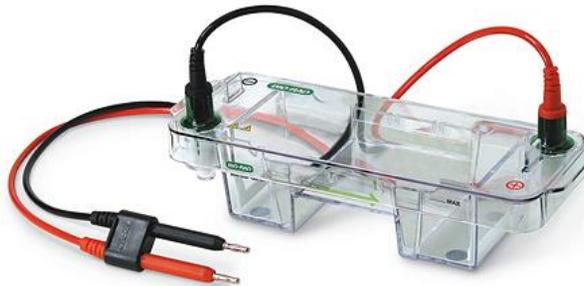


Figura 29. Cubeta de electroforesis para muestras de DNA para 30 muestras de Bio-Rad (California, USA).

Fuente: www.bio-rad.com/es-es/product/mini-sub-cell-gt-cell?ID=85b69e1d-8ee0-4184-96bc-cd47e87d42f6

La carga de las muestras y controles sobre los pocillos del gel se realizó de forma cuidadosa mezclando 5 μ L del producto de PCR con una gota de 2 μ L de tampón de carga (6x) (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). El primer pocillo de cada fila del gel siempre se reserva para 2 μ L del marcador de peso

Material y Métodos

molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)), que está compuesto por fragmentos de DNA de tamaño conocido (Figura 30).

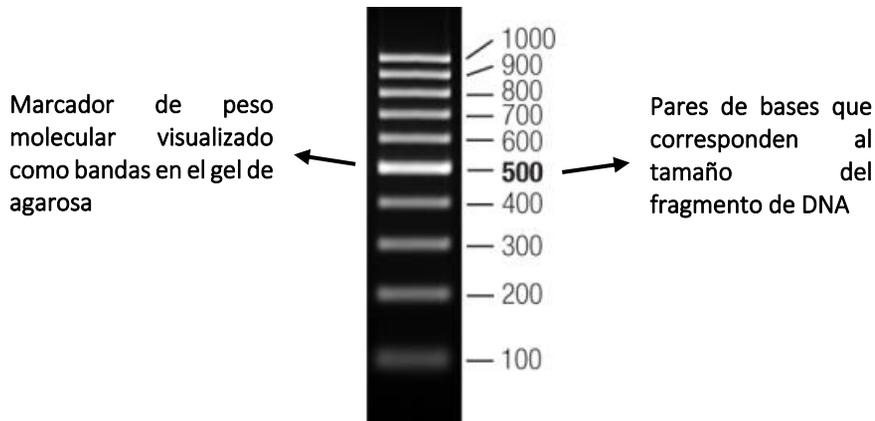


Figura 30. Marcador de peso molecular o escala estándar, GeneRuler 100bp DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

Fuente: www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012997_GeneRuler_100bp_DNALadder_RTU_50ug_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogR2VuZVJ1bGVyIDEwMjBicCBETkEgTGFKZGVyLCBSZWVkeS10by1Vc2U=

Transcurrido el tiempo necesario se aplicó luz ultravioleta al gel para su valoración mediante la visualización en un transiluminador UV/luz blanca (Herolab, Wiesloch, Alemania), el cual nos permite observar mediante fluorescencia los diferentes fragmentos de DNA amplificados, gracias al SafeView, mostrando “bandas” de diferente tamaño y altura (Figura 31).

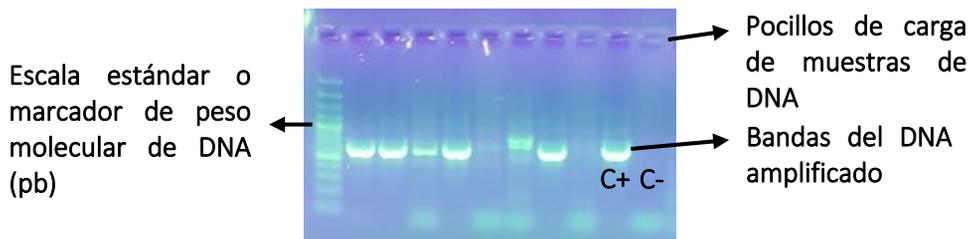


Figura 31. Visualización de un gel de agarosa tras electroforesis mediante un transiluminador UV/Luz blanca.

La comparación de las bandas con la escala estándar proporcionada por el marcador de peso molecular, dispuesto en el primer pocillo, permite determinar el tamaño aproximado de cada fragmento de DNA obtenido.

El grosor de las bandas proporciona una idea aproximada de la cantidad de fragmentos de DNA del mismo tamaño que se han desplazado juntos hasta la misma posición; grupos de fragmentos muy pequeños podrían no ser visibles mediante esta técnica, requiriendo técnicas más sensibles como la qPCR para poder ser detectados.

La interpretación de los resultados se realizó mediante la comparación de las bandas de cada muestra con la banda del control positivo, tras comprobar el tamaño correcto del fragmento con el marcador de peso molecular.

2.3.3.5. Secuenciación de Sanger

Los amplicones de tamaño esperado obtenidas en las PCR de punto final se enviaron de forma sistemática al Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda (Madrid) para su secuenciación con la colaboración del equipo de investigación del Dr. Carmena. Asimismo, se colaboró con el análisis de parte de las muestras del estudio, realizando una estancia en dicho centro de investigación, en la que se profundizó en las técnicas de detección, secuenciación y caracterización molecular

Material y Métodos

de los protozoos entéricos de relevancia en salud pública, algunos de ellos estudiados en la presente tesis doctoral: *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* sp.

La secuenciación de Sanger o determinación de la secuencia de nucleótidos de cada amplicón, se realizó de forma directa en ambas direcciones utilizando los cebadores internos para cada gen mediante electroforesis capilar utilizando el BigDye Terminator (Applied Biosystems, California, USA) en el secuenciador de DNA automatizado ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) para confirmar la presencia y caracterizar las especies de *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp.

Este método fue desarrollado por Frederick Sanger en 1977 (Sanger et al., 1977; García-Sancho, 2010), el cual consiste en la amplificación de múltiples copias del gen diana mediante el DNA molde (amplicón), los cebadores internos de cada parásito, la DNA polimerasa, los nucleótidos (dNTP) y didesoxinucleótidos (ddNTP) marcados con diferentes fluoróforos dependiendo de la base. Estos ddNTP son análogos de los dNTP que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3', imprescindible para la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido durante la amplificación por la DNA polimerasa, por lo que actúan como terminadores de cadena. Al finalizar la reacción, cada muestra contiene fragmentos de diferentes tamaños que terminan en cada una de las posiciones de los nucleótidos del DNA molde. En el extremo de cada fragmento se encuentra el fluoróforo específico del ddNTP final que se detectará mediante electroforesis capilar en gel (Figura 32) separándolos por tamaño, detectándose en primer lugar los fragmentos más pequeños que se desplazan más rápido por el gel y, posteriormente, los más grandes y lentos. El detector laser es el encargado de registrar los diferentes picos de

fluorescencia de cada ddNTP generando el cromatograma (Sanger et al., 1977; Ávila et al., 1995; García-Sancho, 2010).

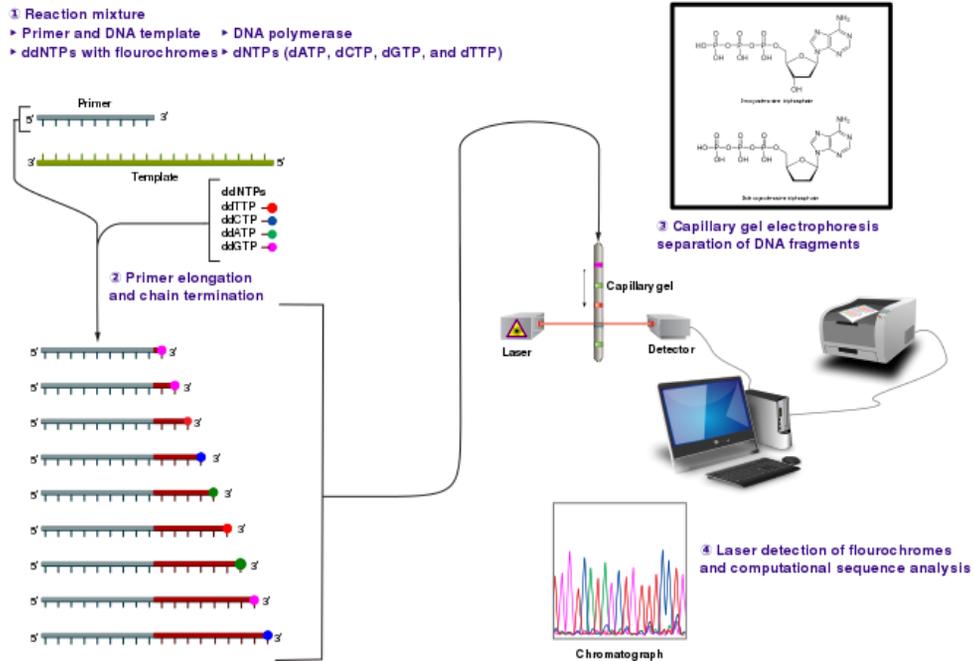


Figura 32. Fundamento de la secuenciación de Sanger y obtención de resultados.

Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg#filelinks>

Los cromatogramas de las secuencias Forward y Reverse obtenidas de cada amplicón se analizaron con el software libre Chromas 2.6.6. (Technelysum Pty Ltd) (Figura 33) y se alinearon con el software gratuito MEGA-X v10.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Figura 34) para la obtención de la secuencia consenso de cada muestra (Kumar et al., 2018).

Material y Métodos

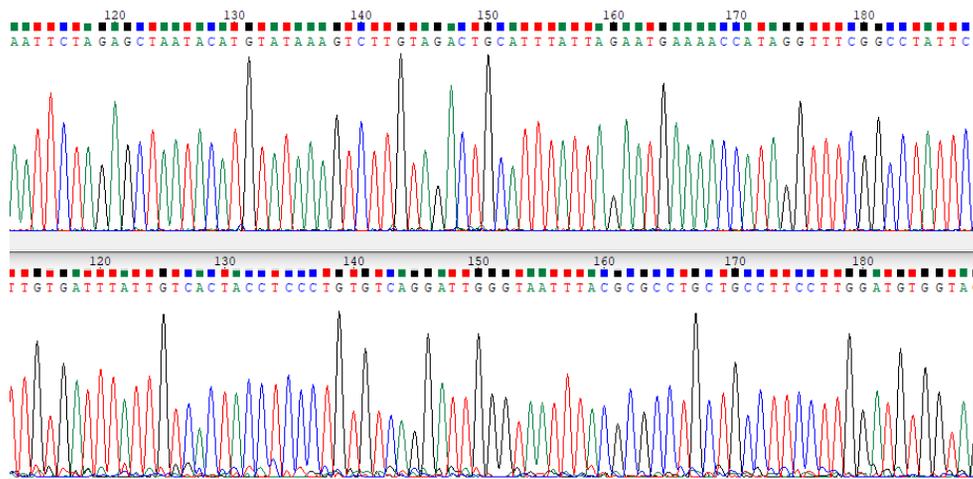


Figura 33. Cromatograma de las secuencias *Forward* (arriba) y *Reverse* (bajo) de una muestra de *Blastocystis* sp. obtenida mediante Chromas 2.6.6.

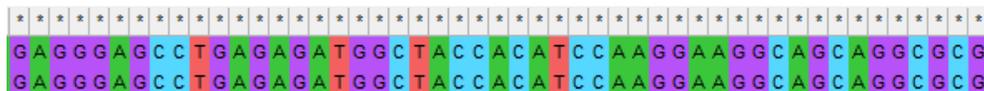


Figura 34. Alineación de las secuencias anteriores en el software MEGA-X para la obtención de la secuencia consenso.

En aquellas secuencias en las que no se obtuvo consenso solamente se utilizó la secuencia obtenida del cromatograma limpio, ya sea *Forward* o *Reverse*, para la identificación y caracterización del parásito.

2.3.3.5.1. Identificación y caracterización de *G. intestinalis*

La caracterización molecular empleando las secuencias de varios genes (Azcona-Gutiérrez et al., 2017), como *gdh* y *bg*, para el análisis de los genotipos y subgenotipos de *G. intestinalis* se denomina genotipado multilocus (MLG o MLST, por sus siglas en inglés (Multilocus Sequence Typing)). En este caso, ambos genes presentan una única copia y una elevada variabilidad en la secuencia de nucleótidos que permitirá la diferenciación entre los genotipos y subgenotipos del parásito, sin

embargo, esto reduce la sensibilidad de la PCR convencional, siendo imposible en ocasiones la amplificación de muestras que resultaron positivas por qPCR (Dacal et al., 2020).

Las secuencias consenso obtenidas mediante Sanger, se analizaron mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de acceso online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) que permite la identificación del parásito mediante la comparación de la secuencia de nucleótidos obtenida con las secuencias depositadas en la base de datos pública del NCBI. La identificación de los diferentes genotipos y subgenotipos se realizó mediante un análisis múltiple de comparación de la secuencia consenso con secuencias de referencia (Tabla 18) haciendo uso del software MEGA-X v10.0.5. Además, este software permitió identificar las múltiples sustituciones o SNPs (Kumar et al., 2018).

Tabla 18. Secuencias de referencia obtenidas en BLAST utilizadas para el genotipado y subgenotipado de *G. intestinalis*

GEN	GENOTIPO	SUBGENOTIPO	REFERENCIA GeneBank
<i>gdh</i>	A	I	L40509
		II	L40510
		III	EU637582
	B	III	AF069059
		IV	L40508
<i>bg</i>	A	I	AY655702.1
		II	AY072723.1
		III	AY072724.1
	B	-	AY072727.1
		III	AY072726
		IV	AY072725

2.3.3.5.1. Identificación y caracterización de *Blastocystis* sp.

El subtipado de *Blastocystis* sp. se realizó mediante la secuenciación del gen SSU rRNA (18S), considerado actualmente el marcador genético mejor representado en

las bases de datos de secuencias de carácter público. La secuenciación de este gen permite identificar los diferentes subtipos y alelos del parásito (Scicluna et al., 2006), para ello las secuencias consenso obtenidas en la secuenciación se analizaron mediante la herramienta de acceso online libre *Blastocystis* (18S) Sequence Typing (<http://pubmlst.org/Blastocystis/>) ubicada en la Universidad de Oxford, desarrollada por Rune Stensvold y Graham Clark, financiada por Wellcome Trust.

2.4. Análisis inmunológico de muestras de saliva

Considerando la posibilidad de que existan pacientes con giardiosis crónica en los que la eliminación de quistes en heces sea extremadamente baja e intermitente, se planteó el empleo de diferentes métodos diagnósticos para aumentar la sensibilidad del análisis. Por este motivo, los métodos parasitológicos, microscópicos y moleculares, realizados en heces se combinaron con métodos inmunológicos de búsqueda de anticuerpos haciendo uso de muestras de saliva. Se ha demostrado que *G. intestinalis* es capaz de estimular tanto la respuesta inmunológica mediada por células (Linfocitos T), como la humoral, por la generación de anticuerpos específicos frente al parásito, los cuales estarán representados bajo el isotipo IgA en la saliva de los afectados y serán producidos por los Linfocitos B (Hooshyar et al., 2019; Trelis et al., 2019).

2.4.1. Detección de anticuerpos IgA secretores anti-*G. intestinalis* mediante ELISA indirecto

Múltiples estudios han detectado la presencia de la inmunoglobulina IgA secretora (IgAs) en muestras de saliva de pacientes con una infección activa por el parásito y cómo éstos reconocían ciertos antígenos nativos específicos de *G. intestinalis*

(Rosales-Borjas et al., 1998; Hasan et al., 2002; Rodríguez et al., 2004; Shatla et al., 2004; Hassan et al., 2005; El-Gebaly et al., 2012; Trelis et al., 2019). En el estudio llevado a cabo por El-Gebaly y colaboradores (2012), se observó cómo dichos anticuerpos eran significativamente más elevados en pacientes con giardiosis activa y cómo, tras la erradicación, desaparecían en un periodo de corta duración. La detección de la IgAs anti-*Giardia* en saliva, muestra de fácil acceso y poco invasiva, es un marcador muy útil de la infección activa por este parásito, facilitando el diagnóstico para aquellos casos en los que el diagnóstico coproparasitológico resulte ineficaz.

La detección en saliva de anticuerpos IgAs específicos de *G. intestinalis* se realizó mediante un ensayo indirecto de inmunoabsorción ligado a enzimas, denominado ELISA indirecto (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que se agrupa dentro de los conocidos enzimoensayos. El ELISA indirecto es una técnica inmunológica de elevada sensibilidad en la que se emplean anticuerpos específicos marcados de forma covalente con una enzima que permiten la detección de pequeñas cantidades del complejo antígeno-anticuerpo que se desea determinar (Madigan et al., 2009).

En este caso se empleó el protocolo de ELISA indirecto “*in-house*” desarrollado por Trelis y colaboradores (2019) para la detección de anticuerpos IgAs salivales específicos de *G. intestinalis*. Este protocolo está basado en los estudios previos de Rodríguez (2004) y El-Gebaly (2012) y colaboradores, utilizando como antígeno el extracto proteico total de trofozoítos del parásito obtenidos en cultivo axénico *in vitro* de tres cepas certificadas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection) (ATCC 30888, ATCC 30957 y ATCC 50137), cedidas por el Dr. Osuna del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.

Material y Métodos

Antes de la realización del ELISA, se requirió de la preparación del antígeno o extracto proteico total a partir de los trofozoítos. En primer lugar, se realizó una centrifugación de los trofozoítos a 2.000 rpm durante 5 minutos para forzar su precipitación. Tras retirar el sobrenadante, se añadió y mezcló el precipitado con 200 μ L del cocktail de inhibidor de proteasas comercial (cOMplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basilea, Suiza) al 1x en tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4). Posteriormente se sometió a la mezcla a un proceso de sonicado (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Misonix, Nueva York, USA): 10 ciclos de 10 segundos con un periodo de enfriamiento en hielo de 1 minuto entre ciclos. Tras este proceso se realizó un centrifugado de 10 minutos a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante o extracto total de proteínas solubles del parásito, conservándolo a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de la proteína soluble total del extracto se realizó mediante el ensayo colorimétrico Protein Assay (Bio-Rad, California, USA) basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), que consiste en añadir al extracto proteico el colorante Azul de Coomasie Brillante G-250 que se unirá a las proteínas dando lugar a un cambio de coloración y de absorción de 465 a 595 nm dependiendo de la concentración proteica que haya en la muestra. Para ello, se mezcló 10 μ L del extracto de *G. intestinalis* con 200 μ L del reactivo Bradford (1:5 = 1mL de reactivo Protein Assay + 4 mL de agua destilada) (Bio-Rad, California, USA) en una placa multipocillo y se determinó la absorbancia en el lector iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, California, USA) a 595 nm mediante el software asociado Microplate Manager v5.0 (Bio-Rad, California, USA). La concentración proteica de cada extracto (μ g/ μ L) se obtuvo a partir de una recta patrón realizada con diluciones de concentración progresiva de albúmina de suero bovino o BSA (Sigma-Aldrich, Misuri, USA), desde 0,1 a 10 mg/mL.

Conocida la concentración del extracto de proteínas se procedió al tapizado de la placa multipocillo de poliestireno y 96 pocillos con fondo plano (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). La solución de tapizado estuvo compuesta por el extracto proteico diluido en *Coating buffer* o solución tampón de carbonato-bicarbonato (0,05M; pH 9,6) para tapizar con 10 µg de antígeno por pocillo.

A cada pocillo se le añadieron 100 µL de la solución de tapizado y se incubó a 4°C *overnight* (durante la noche). A la mañana siguiente se realizó un lavado de la placa con el tampón de lavado PBS-Tween (PBS-T = 500mL de PBS (tampón fosfato salino) + 250 µL de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Misuri, USA)) al 0,05%, para retirar el exceso de antígeno.

Tras el lavado, se “bloqueó” la placa con BSA (Sigma-Aldrich, Misuri, USA) diluido al 0,5% en PBS durante 60 minutos a 37 °C. Este paso bloquea los lugares del fondo del pocillo que han quedado libres tras el tapizado para evitar que el anticuerpo primario (de naturaleza proteica) se una al poliestireno y dificulte la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se desea determinar. De este modo, el anticuerpo sólo se unirá a su antígeno específico reduciendo los falsos positivos. Tras este paso se realizaron 3 lavados con PBS-T al 0,05%.

A continuación, tras eliminar la solución de bloqueo, se añadió 100 µL de saliva diluida 1:2 en PBS-BSA al 0,5% (anticuerpo primario, IgAs anti-*Giardia* salival), cada muestra por duplicado, y se incubó la placa a 37 °C en agitación durante 90 minutos para favorecer la unión específica antígeno-anticuerpo. En este paso se incluyeron salivas control, de pacientes tanto positivos como negativos. Al finalizar la incubación, se realizaron otros 3 lavados de 15 minutos con PBS-T (0,05%) para retirar la solución de saliva.

Material y Métodos

Posteriormente, se añadieron 100 μL de la disolución del anticuerpo secundario 1/10.000 en PBS-BSA (0,5%) y se incubó durante 60 minutos a 37 °C en agitación. El anticuerpo secundario utilizado en este caso fue un anticuerpo anti-IgAs humana procedente de cabra y conjugada con el enzima peroxidasa (Goat polyclonal Anti-Human IgA alpha chain (HRP) (Abcam, Cambridge, UK)). Con esta incubación se buscó favorecer la unión del anticuerpo secundario con el anticuerpo primario (IgAs salival) fijado al antígeno. Al concluir la incubación se realizaron los 3 últimos lavados de 20 minutos con PBS-T (0,05%) para retirar el exceso de anticuerpos.

Por último, se añadieron 100 μL de la solución de revelado (solución con cromógeno ortofenilendiamina (OPD) 0,04% en tampón fosfato-citrato (Na_2HPO_4 0,2M, ácido cítrico 0,1M; pH5) y el sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,001%) y se dejó reposar la placa en total oscuridad durante 10 minutos aproximadamente para que se llevara a cabo la reacción colorimétrica, la cual se interrumpió mediante la adición de 100 μL de ácido clorhídrico 3N.

La reacción colorimétrica se llevó a cabo mediante la acción de la enzima peroxidasa asociada al anticuerpo secundario, que en presencia de su sustrato (H_2O_2) cataliza una reacción enzimática de oxidación-reducción (REDOX) que reduce al cromógeno ortofenilendiamina (OPD) generando compuestos coloreados cuya concentración es proporcional a la concentración del anticuerpo IgAs anti-*Giardia* que se desea determinar (González Otero, 2010).

Así pues, la cuantificación de IgAs anti-*Giardia* presente en cada muestra se determinó mediante la lectura de la absorbancia o densidad óptica (DO) a 490 nm en el lector iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, California, USA) y el software Microplate Manager v5.0 (Bio-Rad, California, USA). Los datos de absorbancia o DO de los negativos permitieron la determinación del límite de

positividad o *cut-off* (media y 3 desviaciones estándar (DS)) para cada placa analizada, necesarios para valorar cada muestra, de tal manera que si los valores de absorbancia de las muestras superaban el *cut-off* se reconocían como positivas, mientras que, si eran inferiores, se consideraban dudosas o negativas.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos recogidos para la presente tesis doctoral fue realizado en colaboración con el Servicio de Estadística de la Universidad de Valencia utilizando el entorno de programación R para el análisis de datos y gráficos.

La mayoría de las variables recogidas son categóricas por lo que, para probar la asociación entre las variables se realizaron las correspondientes tablas de contingencia y se calculó el estadístico de contraste χ^2 o el test exacto de Fisher. Dichos test determinan si la asociación entre las variables es significativa cuando el p-valor es inferior a 0,05. En el caso de existir asociación se empleó el modelo de Poisson para determinar en qué niveles se encuentran los factores de riesgo.

En el caso de trabajar con variables continuas se empleó la técnica de análisis de la varianza Anova, verificando previamente que se cumplieran las condiciones de aplicabilidad.

Tras observar una asociación estadísticamente significativa entre variables, la interpretación de los resultados se realizó a través de los Odds Ratio (OR) calculados con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Además, en cada caso significativo se realizó el Test de Cramer para conocer la fuerza de la asociación entre las variables, pudiendo ser pequeña (Cramer $\geq 0,1$), mediana (Cramer $\geq 0,3$) y grande (Cramer $\geq 0,5$).

La potencia estadística (PE) de los test empleados con relación al tamaño muestral se calculó mediante el programa GPower, contemplando un tamaño del efecto medio (d Cohen = 0,3) y un nivel de significatividad del 5%.

2.6. Consideraciones éticas

La presente Tesis Doctoral obtuvo la certificación y aprobación por los siguientes organismos competentes de la Universidad de Valencia:

- Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, que proporcionó el informe favorable del proyecto (número de procedimiento H1531322418689) dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. Firmado el día 26 de septiembre de 2018 (Anexo 3).
- Comité de Bioseguridad de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, proporcionó el informe favorable sobre las medidas de contención aplicadas (Real Decreto 664/1997) y el cumplimiento de los principios aplicados de Seguridad e Higiene en el trabajo establecidos en la normativa vigente. Firmado el día 30 de noviembre de 2018 (Anexo 4).

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

1.1. Características generales

En la presente tesis doctoral participaron 295 pacientes de la Clínica Universitaria CUNAFF con edades comprendidas entre 4 y 86 años, y una media general de 37,5 años. En la Tabla 19 se pueden observar las características generales de la población estudiada.

Pacientes	n	%
Sexo		
Femenino	216	73,2
Masculino	79	26,8
Edad (años)		
Media	37,5	
Mínimo-Máximo	4-86	
Rangos de Edad (años)		
0-9	15	5,1
10-19	12	4,1
20-30	79	26,8
31-50	125	42,4
>50	64	21,7
Lugar de residencia		
Provincia de Valencia	252	85,4
Provincia de Castellón	23	7,8
Provincia de Alicante	7	2,4
Otras provincias	13	4,4

En general, se dio un mayor porcentaje de participación de pacientes del sexo femenino (73,2%; 216/295) que del sexo masculino (26,8%; 79/295).

Resultados

Debido a la amplia diversidad en la edad de los pacientes incorporados en el estudio, se establecieron 5 grupos o rangos de edad diferentes como se muestra en la Tabla 19, que permitieron categorizarlos para el análisis estadístico. El grupo de edad con mayor participación fue el de los 31 y 50 años (42,4%), seguido de pacientes entre los 20 y 30 años (26,8%), y mayores de 50 años (21,7%). Los de menor participación fueron los pacientes de los rangos entre 0 y 9 años (5,1%) y los 10 y 19 años (4,1%) debido a que la clínica CUNAFF se dedica mayoritariamente al tratamiento del paciente adulto.

Respecto al lugar de procedencia, se dio una mayor participación de pacientes residentes en la provincia de Valencia (85,4%), seguida de pacientes de localidades de las provincias de Castellón (7,8%) y Alicante (2,4%), debido a la localización de la Clínica en la ciudad de Valencia. Asimismo, se obtuvo una pequeña participación de individuos de otras provincias externas a la Comunidad Valenciana (4,4%) como Madrid, Murcia o Almería, entre otros.

1.2. Trastornos Gastrointestinales Crónicos y patologías asociadas

La entrevista inicial y la revisión de las pruebas diagnósticas aportadas por los pacientes proporcionaron la información necesaria respecto a los TGC y otras patologías presentes en la población de estudio. Para todos aquellos pacientes que proporcionaron una información diagnóstica válida, según nuestro criterio, los datos se resumen en la Tabla 20.

Las intolerancias/malabsorciones a los carbohidratos fueron los TGC más prevalentes en la población de estudio afectando al 84,3% de los pacientes (198/235), de las cuales la intolerancia/malabsorción a la fructosa (IF) fue la más

frecuente, detectada en el 77,0% de los pacientes (177/232), seguida de la intolerancia/malabsorción a la lactosa (IL), presente en el 57,3% de los pacientes (133/232).

Tabla 20. Patologías presentes en la población de estudio		
Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)	n	%
Intolerancia/malabsorción a carbohidratos	198	84,3
Lactosa (IL)	133	57,3
Fructosa (IF)	177	77,0
Síndrome de Intestino Irritable (SII)	59	24,4
Enfermedad Celíaca (EC)	65	39,6
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)	25	9,9
Enfermedad de Crohn (E. Cr)	8	3,2
Colitis Ulcerosa (CU)	17	6,7
Gastritis crónica	74	27,3
Otras patologías gastrointestinales	n	%
Sobrecrecimiento bacteriano (SIBO)	67	65,7
<i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	64	29,1
Otras patologías	56	19,0
Enfermedades extraintestinales	n	%
Enfermedades autoinmunes	79	27,3
Alergias	90	33,6

Con menor prevalencia, entre los pacientes que aportaron pruebas al respecto, se presentaron los TGC como la EC (39,6%; 65/164), la gastritis crónica (27,3%; 74/271), el SII (24,4%; 59/242) y la EII (9,9%; 25/252), siendo la E. Cr un 3,2% (8/252) y la CU un 6,7% (17/252). Asimismo, se detectaron otras patologías intestinales como el SIBO (65,7%; 67/102), la infección por *H. pylori* (29,1%; 64/220) y otras patologías (19,0%; 56/294).

De forma complementaria, se observaron en la población de estudio ciertas patologías extraintestinales, que se relacionan con ciertos TGC como son las alergias

(con una prevalencia del 33,6%; 90/268) y algunas enfermedades autoinmunes (27,3%; 78/289) como la diabetes mellitus tipo 1, entre otras.

1.3. Sintomatología

La sintomatología gastrointestinal crónica presente en la población de estudio se muestra en la Figura 35. El síntoma que se observó en un mayor porcentaje de casos fue el dolor abdominal, presente en un 91,2% de los participantes, seguido de las flatulencias y distensión abdominal (89,5% y 85,4%, respectivamente), presencia de grasa en heces (66,1%), dispepsia (53,6%), alteración del hábito intestinal con tendencia a diarrea (51,3%) y otros síntomas menos prevalentes.

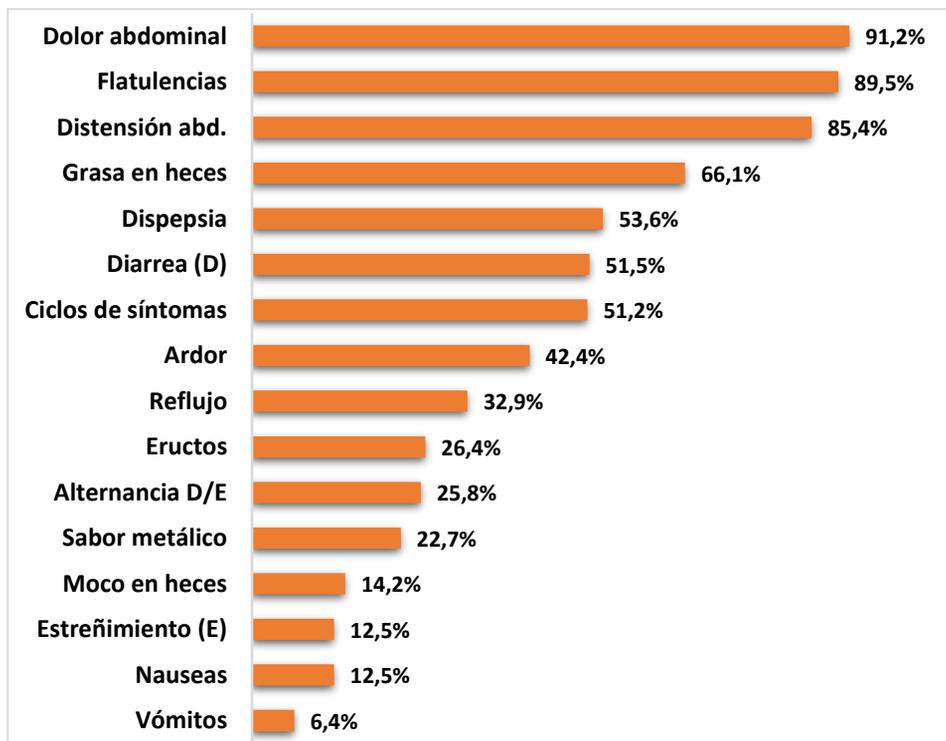


Figura 35. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en la población de estudio. abd.: abdominal.

La frecuencia media de deposiciones diarias de la población de estudio fue de 2,2. Además, cabe destacar que se observó una sintomatología intestinal cíclica en el 51,2% de los pacientes a estudio, suceso que puede relacionarse con el ciclo biológico de los parásitos intestinales estudiados e, incluso, algunos TGC como la EII. Asimismo, se recogió información sobre la posible sintomatología extraintestinal presente en los participantes (Figura 36) ya que están descritas en enteroparasitosis o alteraciones crónicas de la mucosa, y en consecuencia en casos de alteración de la absorción intestinal.

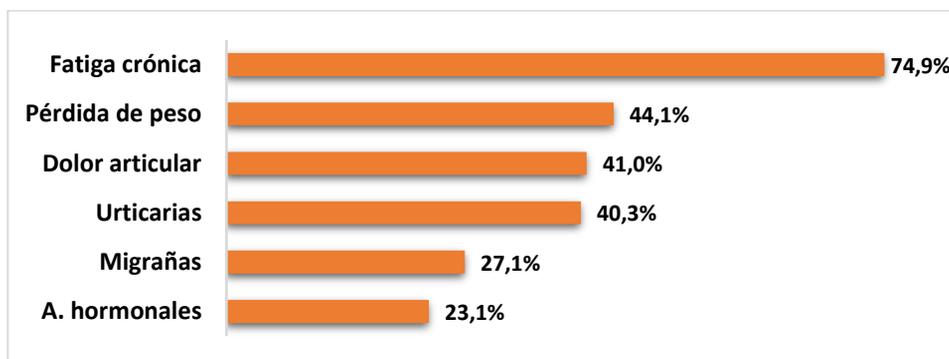


Figura 36. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en la población de estudio. A. hormonales: alteraciones hormonales.

En este caso, se observó que un 74,9% de los pacientes presentaban fatiga crónica o cansancio, seguido de una pérdida de peso acusada (44,1%), dolor articular (41,0%), urticarias (40,3%), migrañas o cefaleas (27,1%) y, por último, alteraciones hormonales en general, incluyendo casos de infertilidad y endometriosis (23,1%).

1.4. Desencadenantes y antecedentes de los TGC y/o sintomatología

En la Tabla 21, se muestra la información recopilada en la entrevista inicial sobre el posible desencadenante de la sintomatología según la percepción del paciente, lo cual resulta de interés en la valoración general. Así mismo, se trató de registrar el tiempo aproximado de inicio, las patologías o sintomatologías previas en el paciente o en familiares de primer grado, y las infecciones parasitarias previas.

	<i>n</i>	%
Desencadenante, Origen		
Viajes a países exóticos	17	5,8
Alimentario	15	5,1
Estrés u otro origen psicológico	18	6,1
Intervenciones quirúrgicas	12	4,1
Antibióticos o probióticos	8	2,7
Patógenos (virus, parásitos, bacterias...)	16	5,4
Inicio de la sintomatología		
Infancia	31	10,5
Adolescencia	31	10,5
Edad adulta	214	72,5
Antecedentes de patología o sintomatología		
Sintomatología previa del paciente o familiares	119	40,3
Antecedentes parasitológicos		
Parasitosis previas	124	42,0

Una mayoría de los pacientes (70,9%) desconocía la posible causa u origen de la sintomatología y/o patología que sufrían, sin embargo, un 6,1% de los pacientes culparon al estrés o a otras condiciones psicológicas del inicio de los síntomas, seguido de los viajes a países exóticos (5,8%), la mayoría endémicos de ciertas

parasitosis, continuando por infecciones de origen microbiano (5,4%), alimentario (5,1%) y quirúrgico (4,1%) y, por último, tras la toma de antibióticos o probióticos (2,7%).

El inicio de la sintomatología, intestinal o extraintestinal, y el posterior diagnóstico de los TGC, se dio principalmente en la etapa adulta (72,5%), mientras que en un 10,5% de los pacientes ocurrió en la infancia y en la adolescencia. Sin embargo, un 40,3% de los pacientes reconoció que anteriormente, en otra etapa de su vida, habían padecido ciertos síntomas que podrían relacionarse con su situación actual, o que familiares de primer grado padecían sintomatología similar o patologías que podrían transmitirse genéticamente, como, por ejemplo, la enfermedad celíaca o una intolerancia genética a lactosa.

Por último, un 42,0% de los pacientes reconoció que anteriormente habían sufrido infecciones parasitarias intestinales, siendo los más frecuentes el helminto *Enterobius vermicularis*, mejor conocido como el gusano de los niños, sobre todo en la infancia, y los protistas *Blastocystis* sp. y *Giardia intestinalis*.

2. FRECUENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO DE ESPECIES

La población de estudio se clasificó en grupos según el estado parasitológico, diferenciando los pacientes con una infección parasitaria activa de los no parasitados. El 67% (197/295) de la población analizada fue diagnosticada de una infección parasitaria intestinal, pasando a formar parte del grupo de **parasitados** o **Grupo P**, mientras que el 33% restante (98/295) formarían el grupo de **no parasitados** o **Grupo NP**.

Las especies parásitas diagnosticadas en la población de estudio fueron en mayor medida protistas y algún caso aislado de helmintos. Los parásitos más prevalentes se muestran en la Tabla 22, donde se puede observar que, dentro de los protistas, la especie más frecuente resultó ser *G. intestinalis* con un porcentaje de parasitación del 61,7% (182/295), seguido de *Blastocystis* sp. con un 13,2% (39/295), y de otros menos prevalentes con un 3,7% (11/295), entre los que se encuentran las amebas: *Endolimax nana* (1,4%; 4/295), *Entamoeba coli* (0,7%; 2/295), *Entamoeba hartmanni* (0,3%; 1/295) y el complejo *Entamoeba* formado por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii/bangladesi* (0,3%; 1/295) y los casos puntuales de helmintos, por *E. vermicularis* (1,4%; 4/295) y *Strongyloides stercoralis* (0,3%; 1/295), cuyo diagnóstico fue realizado fuera del estudio y presentado por el paciente. Todas las especies incluidas en el subgrupo “Otros” se diagnosticaron en coinfección con uno o varios de los parásitos más prevalentes.

Tabla 22. Especies parásitas más prevalentes en la población de estudio

Especies parásitas	<i>n</i>	%
<i>Giardia intestinalis</i>	182	61,7
<i>Blastocystis</i> sp.	39	13,2
Otros:	11	3,7
<i>Enterobius vermicularis</i>	4	1,4
<i>Endolimax nana</i>	4	1,4
<i>Entamoeba coli</i>	2	0,7
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	0,3
Complejo <i>Entamoeba</i>	1	0,3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0,3

La mayoría de las especies menos prevalentes se consideran parásitos con menor relevancia clínica como las amebas intestinales: *E. nana*, *E. coli*, *E. hartmanni* y *E. dispar*. Mientras que las especies *E. histolytica* (ameba patógena incluida en el complejo morfológico *Entamoeba*), y *E. vermicularis* y *S. stercoralis* (helminetos) se consideran patógenas y deben ser tratadas.

2.1. Prevalencia de parasitación en función del sexo

La prevalencia de parasitación de la población de estudio en función del sexo se muestra en la Tabla 23, donde se observa una ínfima diferencia en los resultados, siendo en ambos casos mucho mayor el número de pacientes parasitados (66,2% en el sexo femenino y 68,4% en el masculino) que el de no parasitados (33,8% y 31,6%, respectivamente).

Respecto a las especies parásitas presentes en ambos sexos (Figura 37), el parásito más prevalente fue *G. intestinalis*, cuya presencia fue mayor en el sexo femenino (63,0%) que en el masculino (58,2%).

Resultados

Sexo	Grupo P		Grupo NP	
	n	%	n	%
Femenino (n=216)	143	66,2	73	33,8
Masculino (n=79)	54	68,4	25	31,6

El segundo parásito más frecuente fue *Blastocystis* sp., en el que se observó una mayor frecuencia en los pacientes del sexo masculino (16,5%) que en los del sexo femenino (12,0%).

En ningún caso se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

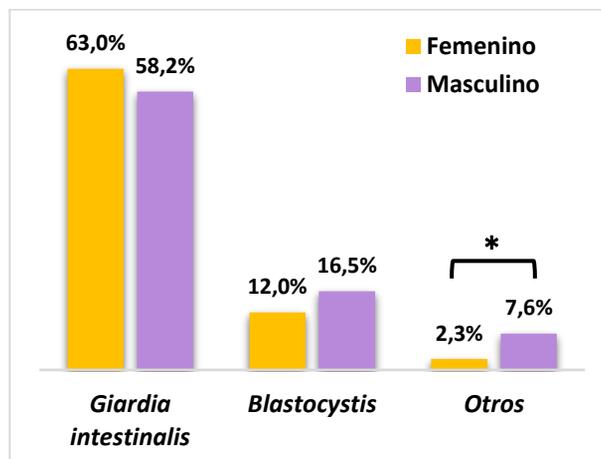


Figura 37. Parásitos más prevalentes en función del sexo.

Si embargo, en el caso de los otros parásitos encontrados, la prevalencia fue mayor para hombres (7,6%) que para mujeres (2,3%), encontrándose una asociación significativa entre ellos (p -valor=0,0001; OR=13,8).

2.2. Prevalencia de parasitación en función de la edad

A continuación, se muestra la distribución de los casos parasitados en función de los grupos de edad de la población de estudio (Tabla 24).

Grupos de Edad (años)	Parasitados	
	<i>n</i>	%
0-9 (n=15)	8	53,3
10-19 (n=12)	7	58,3
20-30 (n=79)	59	74,7
31-50 (n=125)	81	64,8
>50 (n=64)	42	65,6

Como se observa en la Tabla 24 el grupo de edad con mayor porcentaje de parasitación fue el de los pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 30 años (74,7%), seguido de aquellos pacientes con edades superiores a los 50 años (65,6%), los que se encuentran entre los 31 y 50 años (64,8%). Los grupos de edad con menor tasa de participación fueron aquellos con edades comprendidas entre los 10 y 19 años y entre los 0 y 9 años, sin embargo, la prevalencia de parasitación también fue elevada, aunque inferior al resto de grupos, con porcentajes del 58,3% y 53,3%, respectivamente (Tabla 24).

Como se puede observar en la Figura 38, el parásito más prevalente en todos los grupos fue *G. intestinalis* con porcentajes del parásito similares entre los diferentes grupos, siendo el más elevado el 67,1% (53/79) del grupo de pacientes con edades entre los 20 y 30 años, y el inferior, el 53,3% (8/15) obtenido en el grupo de edad entre los 0 a 9 años.

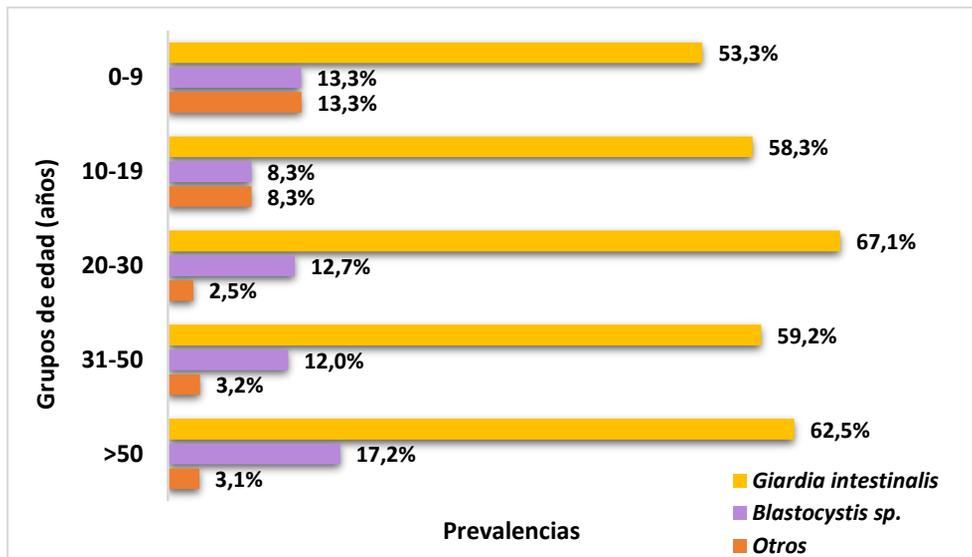


Figura 38. Parásitos más prevalentes en función de los grupos de edad.

Blastocystis es el siguiente protista con mayor prevalencia (Figura 38), con porcentajes de parasitación que varían desde el 8,3% (7/12) en los pacientes con edades entre los 10 y 19 años, hasta el 17,2% (11/64) en el grupo de edad superior a los 50 años.

Respecto a la prevalencia de parasitación por otras especies menos frecuentes en la población de estudio, se apreció una mayor prevalencia en los pacientes más pequeños (0-9 años) con un 13,3% de parasitación en comparación con el resto de los grupos (Figura 38).

2.3. Monoparasitismo y multiparasitismo

En las infecciones parasitarias pueden darse varios tipos de parasitismo, cuando se producen por un solo parásito se denomina monoparasitismo, mientras que si está

originada por 2 o más parásitos de forma simultánea en un mismo hospedador se denomina multiparasitismo.

Tras el análisis de los datos obtenidos de la población parasitada (n=197), se observó un predominio de casos de monoparasitismo (84,8%) respecto del multiparasitismo (15,2%).

En los pacientes del grupo P que presentaron multiparasitismo (n=30), el biparasitismo, o coinfección por dos parásitos en el mismo hospedador, mostró una prevalencia muy superior, con un 83% de los casos (25/30), al triparasitismo, con un 14% (4/30), o tetraparasitismo, con un 3% (1/30), que corresponden a las coinfecciones por 3 y 4 parásitos, respectivamente, y que presentaron un porcentaje de casos mucho menor.

Respecto a las diferentes especies parásitas, en el caso del monoparasitismo (n=167), se obtuvieron unas prevalencias del 92% para *G. intestinalis* (154/167) y del 8% para *Blastocystis* (13/167). No se encontró otra especie que afectara a los pacientes de forma individual.

La coinfección más frecuente entre los pacientes biparasitados (n=25) fue la producida por *G. intestinalis* y *Blastocystis* (76%; 18/25), seguido de coinfecciones menos prevalentes entre diferentes protistas (12%; 3/25) como *Blastocystis* sp. con *E. hartmanni* (4%; 1/25) y *E. nana* (4%; 1/25), *E. coli* con el complejo *Entamoeba* (4%; 1/25), y entre protistas y helmintos (12%; 3/25) como *G. intestinalis* con *E. vermicularis* (8%; 2/25) y con *S. stercoralis* (4%; 1/25).

El resto de multiparasitismos, con distribución de casos mucho menor, muestran una prevalencia elevada de protistas, en el caso de los 4 pacientes triparasitados (14%) se encontró en un 50% (2/4) la coinfección por *G. intestinalis*, *Blastocystis* y *E.*

Resultados

nana, en un 25,0% (1/4) la producida por *G. intestinalis*, *Blastocystis* y *E. coli* y, por último, en un 25,0% (1/4) la infección por *G. intestinalis*, *Blastocystis* y *E. vermicularis*. En el caso del tetraparasitismo (3,0%), solamente un paciente presentó una coinfección por cuatro especies parásitas distintas: *G. intestinalis*, *Blastocystis* sp., *E. nana* y *E. vermicularis*.

3. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Para optimizar el diagnóstico parasitológico en la población de estudio se emplearon las diferentes técnicas descritas en la sección de Material y Métodos en función de la especie parásita.

3.1. Diagnóstico de *G. intestinalis*

El diagnóstico parasitológico empleado para la detección de *G. intestinalis* constó de la combinación de las técnicas expuestas en la Tabla 25.

En primer lugar, se realizó el análisis coprológico mediante la visualización de las heces concentradas con el microscopio óptico para la búsqueda de quistes y/o trofozoítos de *G. intestinalis*. Mediante esta técnica, se lograron diagnosticar 13 pacientes positivos (4,4%) (Tabla 25). En segundo lugar, y para la mejora de la detección de casos positivos de este protozoo, se empleó el enzimoimmunoensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpo específicos en muestras de saliva. Mediante esta técnica se obtuvieron 135 pacientes positivos (45,8%), consiguiendo porcentajes de parasitación más elevados que con el análisis coprológico (Tabla 25).

Por último, se emplearon técnicas de biología molecular para observar si la sensibilidad y especificidad del diagnóstico coprológico aumentaba, para ello se realizó una qPCR de las muestras de DNA total extraído de las heces concentradas (de 3 muestras fecales) obteniendo un porcentaje de positividad del 46,8% (138/295), valor muy similar al obtenido mediante el ELISA indirecto.

Resultados

PACIENTES	Positivos	
	n	%
Microscopía óptica	13	4,4
ELISA	135	45,8
qPCR ¹	138	46,8

¹Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

En cuanto al empleo de las diferentes técnicas diagnósticas, en la Figura 39 se puede observar que solamente el 4,4% (8/182) de los pacientes parasitados por *G. intestinalis* (n=182) fueron positivos mediante la combinación de las 3 técnicas realizadas, el 4,9% (9/182) mediante la combinación del análisis coprológico y ELISA indirecto, y el 6,6% (12/182) resultaron positivos mediante microscopía y qPCR. No obstante, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación del ELISA junto con la qPCR (50,5%; 92/182).

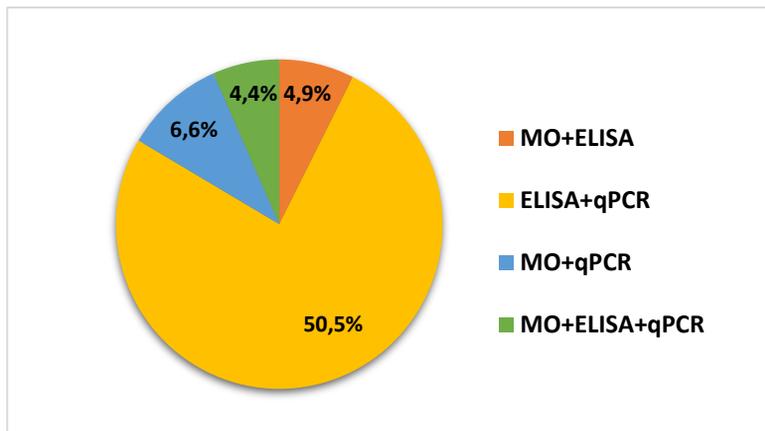


Figura 39. Porcentajes de positivos con los diferentes métodos combinados empleados para el diagnóstico de *G. intestinalis*. MO: microscopía óptica; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

Como dato de interés, seis de los pacientes que resultaron negativos en el análisis coprológico y ELISA, manifestaron valores de anticuerpos IgAs en saliva

excesivamente bajos, sugiriendo una posible inmunodeficiencia selectiva de estos anticuerpos a nivel de mucosas. Asimismo, dos de los pacientes fueron positivos mediante PCR a tiempo real. Estos resultados revelan la importancia de combinar los diferentes métodos diagnósticos para una detección óptima de *G. intestinalis*.

3.2. Diagnóstico de *Blastocystis* sp.

La detección de *Blastocystis* sp. en la población de estudio se realizó mediante las técnicas expuestas en la Tabla 26.

PACIENTES	Positivos	
	n	%
Microscopía óptica	23	7,8
PCR convencional	29	9,8

Mediante el análisis coprológico se lograron detectar 23 pacientes positivos de *Blastocystis* (7,8%), superando los casos diagnosticados de *G. intestinalis* mediante este método, debido a que *Blastocystis*, al ser un parásito colónico, aparece en las heces de los hospedadores con mayor frecuencia que *G. intestinalis*, parásito que habita en la parte alta del intestino delgado y emite quistes de forma intermitente en pacientes con patología gastrointestinal crónica.

Para conocer si se producía un aumento de la sensibilidad y especificidad en la detección de este protista, se empleó la técnica de análisis molecular PCR convencional, obteniendo un resultado de 29 pacientes positivos (9,8%), valor similar al obtenido mediante el análisis coprológico (Tabla 26) y mucho menor que el obtenido en el caso de *G. intestinalis*, debido a la menor sensibilidad de la PCR convencional frente a la PCR a tiempo real.

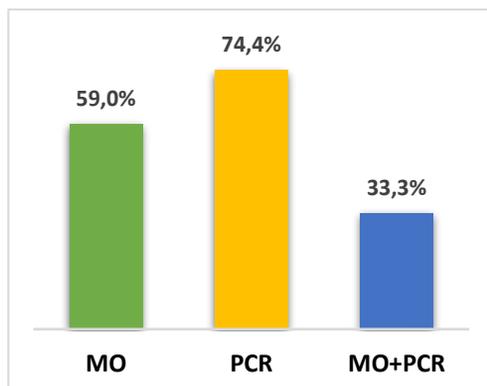


Figura 40. Porcentajes de positividad de los diferentes métodos diagnósticos de *Blastocystis* sp. por separado y combinados. MO: microscopía óptica; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Del total de los pacientes diagnosticados con *Blastocystis* (n=39), el 33,3% (13/39) fueron positivos por ambas técnicas. En la Figura 40, se pueden observar los diferentes porcentajes de casos diagnosticados tanto en los métodos por separado como conjuntamente.

4. ANÁLISIS MOLECULAR

4.1. Caracterización molecular de *G. intestinalis*

De los 182 pacientes positivos de *G. intestinalis* un total de 138 muestras de DNA fueron positivas mediante la qPCR. Los valores de ciclo umbral o Ct obtenidos oscilaron entre 23 y 43, con un valor medio de 35,8. El 12,3% (17/138) de las muestras obtuvieron valores de Ct inferiores o iguales a 30, mientras que el 87,7% (121/138) fueron superiores.

No obstante, y aunque los valores de Ct considerados óptimos para lograr el genotipado y subgenotipado del parásito son aquellos inferiores o iguales a 30 (Muadica et al., 2020), se intentaron secuenciar todas las muestras mediante la combinación de los dos marcadores moleculares descritos anteriormente.

De las 138 muestras de DNA positivas mediante qPCR solamente el 38% fueron secuenciadas (52/138), esto se debe a que mediante la PCR convencional realizada con ambos marcadores se obtuvo un porcentaje de positividad del 40% en gel de agarosa (55/138), mientras que el 60% (83/138) resultaron negativas, porcentaje esperado debido a los elevados valores de Ct obtenidos en la qPCR.

De las 55 muestras positivas en el gel de agarosa mediante PCR convencional el porcentaje de éxito obtenido en la secuenciación alcanzó el 94,5% (52/55), mientras que el 5,5% (3/55) de las muestras amplificadas mediante la PCR convencional resultaron no tipables (Figura 41).

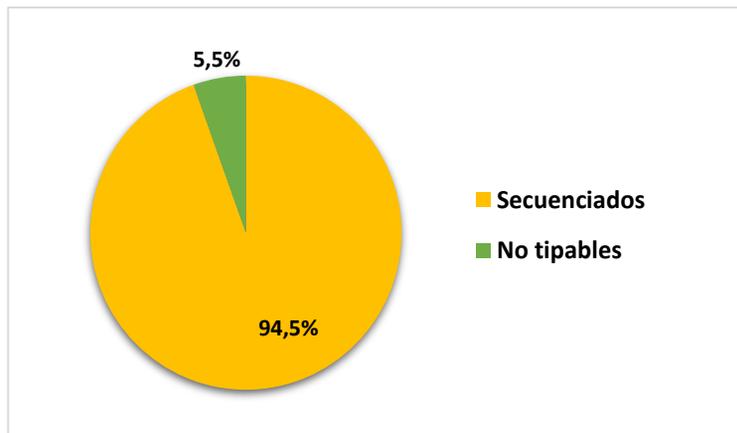


Figura 41. Resultados obtenidos en la secuenciación de las muestras positivas de *G. intestinalis* mediante PCR convencional (n=55).

De las 52 muestras secuenciadas, el 55,8% (29/52) fueron amplificadas y secuenciadas con éxito mediante el análisis del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*), mientras que, con el empleo de otro marcador molecular complementario, el gen de la beta-giardina (*bg*) se logró genotipar el 92,3% (48/52) de las muestras.

El análisis de las secuencias confirmó la presencia de los genotipos que parasitan habitualmente al ser humano, encontrando una mayor prevalencia del genotipo A (96%; 50/52) que del genotipo B (4%; 2/52) en los aislados genotipados.

La mayor parte de las secuencias del genotipo A fueron asignadas al subgenotipo AII (46,2%; 24/52), seguido de un subgenotipo ambiguo AI/AII (40,4%; 21/52) y, en menor porcentaje, el AI (9,6%; 5/52). Las secuencias de los 2 aislados del genotipo B se asignaron por igual al genotipo BIII y BIV (1,9% cada uno; 1/52).

En la Tabla 27, se muestran la diversidad, prevalencia y las principales características de las secuencias de *G. intestinalis* obtenidas mediante ambos genes.

GEN	GENOTIPO	SUBGENOTIPO	REFERENCIA <i>GeneBank</i>	n	SNP ¹
<i>gdh</i>	A	AI	L40509	13	---
				9	C492T
				1	T269Y ²
				1	G285T, C492T
				1	G293C, C492T
	AII	L40510	2	---	
B	BIII	AF069059	1	C99T, T147C, G150A, T276C, C309T, C336T	
	BIV	L40508	1	T183C, A223T, T387C, C396T, C423T	
<i>bg</i>	A	AI	AY655702.1	2	---
				1	T87C, T336C
		AII	AY072723.1	4	---
				39	T561C
				1	A272G
				1	A185G, T561C
	B	III	-	0	-
		IV	-	0	-

¹Polimorfismo de un único nucleótido; ²Y = doble pico C/T

Para el gen *gdh*, del total de 25 secuencias analizadas pertenecientes subgenotipo AI, 13 fueron idénticas a la secuencia de referencia L40509, mientras que 12 presentaron polimorfismos de un único nucleótido (SNP). El SNP más frecuente en este subgenotipo fue el C492T (sustitución del nucleótido C por el T en la posición 492 de la secuencia analizada en comparación con la secuencia de referencia) que se encontró en 9 de las secuencias, seguido de otros SNP menos prevalentes como el T269Y (Y = doble pico C/T en la posición 269 de la secuencia analizada en comparación con el nucleótido T de la secuencia de referencia) y las combinaciones de SNPs G285T y C492T, G293C y C492T, que se encontraron en una secuencia cada uno (Tabla 27). En el caso del subgenotipo AII, las dos secuencias analizadas fueron idénticas a la de referencia (L40510), sin presentar SNPs (Tabla 27).

Resultados

En el caso de las dos secuencias correspondientes al genotipo B, tanto la secuencia del subgenotipo BIII como la del BIV, presentaron una diferencia genética con variaciones de 6 y 5 SNPs con las secuencias de referencia AF069059 y L40508, respectivamente, sin presentar dobles picos. Los SNPs hallados en la secuencia del subgenotipo BIII fueron: C99T, T147C, G150A, T276C, C309T y C336T, y en la del subgenotipo BIV: T183C, A223T, T387C, C396T y C423T (Tabla 27).

En el gen *bg*, de las 3 secuencias analizadas del subgenotipo AI, 2 no presentaron cambios respecto a la de referencia (AY655702.1), mientras que 1 se diferenció al presentar los SNPs T87C y T336C (Tabla 27). En el caso del subgenotipo AII, de las 45 secuencias analizadas 4 fueron iguales a la de referencia (AY072723.1), mientras que 41 presentaron SNPs, siendo el más frecuente el T561C, presente en 39 de las secuencias, seguido del A272G y de la combinación A185G y T561C, que se presentaron en 1 secuencia cada uno (Tabla 27). No se obtuvo ninguna secuencia del genotipo B mediante este gen.

Dentro del genotipo A, 21 de las secuencias analizadas mediante ambos genes obtuvieron un subgenotipo final ambiguo AI/AII. Todas las secuencias AI/AII fueron designadas al subgenotipo AI mediante el gen *gdh* y al subgenotipo AII mediante el *bg*.

Al realizar el análisis estadístico, no se hallaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos/subgenotipos en cuanto a edad y sexo, debido a la baja frecuencia del genotipo B y el subgenotipo AI, y a la elevada prevalencia del subgenotipo ambiguo AI/AII.

4.2. Caracterización molecular de *Blastocystis* sp.

De los 39 pacientes positivos de *Blastocystis* sp., un total de 29 muestras de DNA fueron positivas mediante la PCR convencional. La Figura 42 muestra el porcentaje de casos que fueron secuenciados con éxito (79,0%; 23/29) y de casos cuyo subtipo no se pudo determinar (21,0%; 6/29) debido a que las bandas obtenidas en el gel de agarosa eran débiles dando lugar a secuencias de baja calidad.

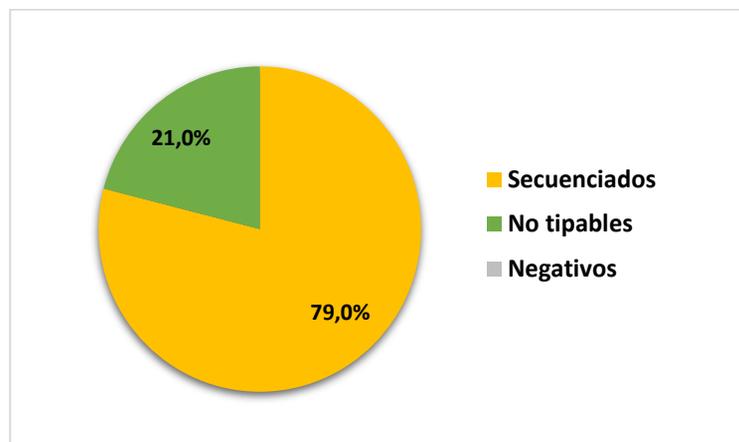


Figura 42. Resultados obtenidos en la secuenciación de las muestras supuestamente positivas en gel de *Blastocystis* mediante PCR convencional.

Al analizar las 23 secuencias del gen *SSU* de *Blastocystis* se identificaron cinco de los subtipos habituales en el ser humano. El subtipo con mayor prevalencia en la población de estudio fue el ST2 con un 30,4% de parasitación (7/23), seguido de los ST3 y ST4, ambos con un porcentaje del 21,7% (5/23), ST1 con un 17,4% (4/23) y, por último, el ST6 con un 8,7% (2/23) (Figura 43). El ST6 se considera un subtipo raro en el ser humano, encontrado más frecuentemente en aves y murciélagos (Cian et

Resultados

al., 2017). No se detectaron infecciones mixtas de diferentes subtipos en un mismo hospedador, ni subtipos específicos de otros hospedadores no humanos.

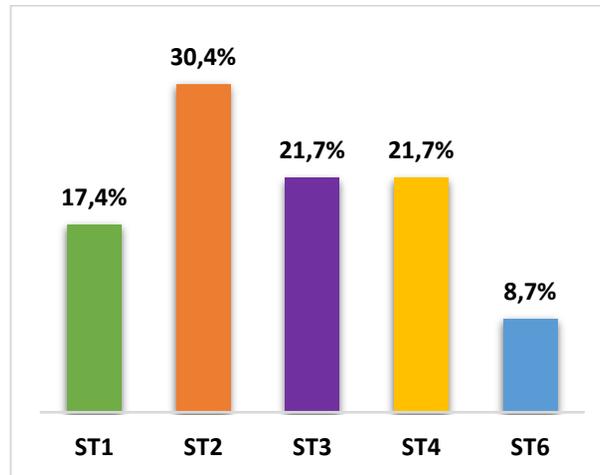


Figura 43. Frecuencia de los subtipos (ST) de *Blastocystis* sp.

En la Figura 44, se muestra la diversidad genética y frecuencia de las secuencias de *Blastocystis* obtenidas mediante el gen *SSU*. La mayor diversidad genética se detectó en el ST2, donde se observaron los alelos 9 (4,3%), 12 (13,0%) y 11+12 (13,0%), seguido del ST6, con los alelos 123 (4,3%) y 122+123 (4,3%) (Figura 44). Además, en el caso de los ST2 que presentaron el alelo 11+12, de las 3 secuencias analizadas 2 mostraron el SNP A74R y 1 el SNP A168R, ambos con un doble pico A/G (R) sustituyendo al nucleótido A de la secuencia de referencia en la posición indicada.

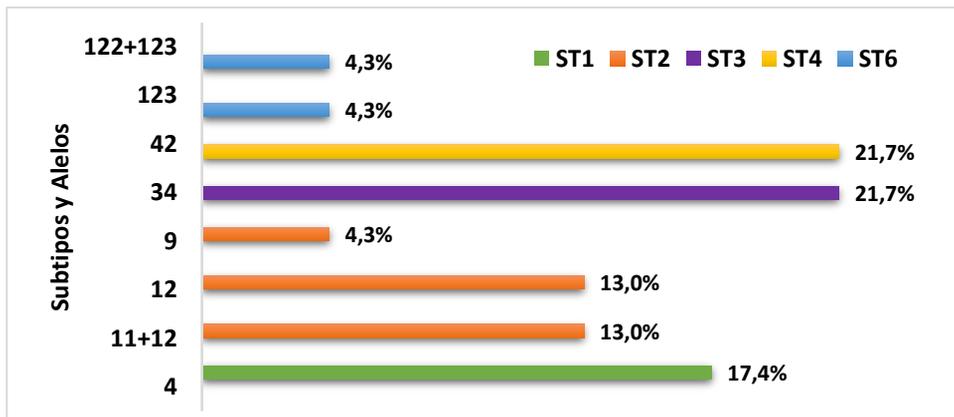


Figura 44. Diversidad y frecuencia de los ST de *Blastocystis* sp.

En el caso de los ST2 con el alelo 12, de las tres secuencias analizadas dos fueron idénticas a la secuencia de referencia, mientras que una presentó los SNPs A168R y A250W, ambos con un doble pico A/G (R) y A/T (W), respectivamente, sustituyendo al nucleótido A presente en la secuencia de referencia. Continuando con el ST6, la secuencia analizada que presentó el alelo 122+123 también mostró el SNP A64R (doble pico A/G (R) sustituyendo al nucleótido A de la secuencia de referencia).

En cambio, solamente se observaron los alelos 4 en el ST1 (17,4%), 34 en el ST3 (21,7%) y 42 en el ST4 (21,7%) (Figura 44), no presentando ninguno de ellos SNPs en su secuencia nucleotídica.

4.2.1. Distribución de subtipos en función del sexo

De las 29 muestras de DNA positivas para *Blastocystis* sp. mediante PCR convencional, un total de 18 pertenecían a pacientes del sexo femenino y 11 a pacientes del sexo masculino.

Resultados

Al analizar las secuencias obtenidas de *Blastocystis* en función del sexo, se encontraron diferencias no estadísticamente significativas en la frecuencia de parasitación de los subtipos descritos entre ambos sexos (Figura 45).

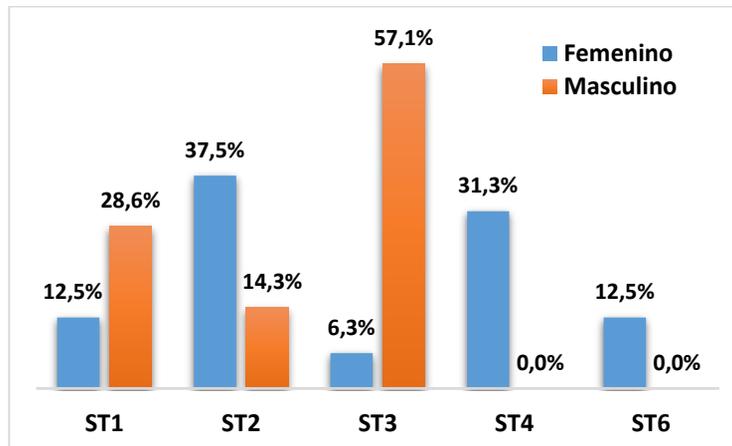


Figura 45. Prevalencia de los ST de *Blastocystis* en función del sexo.

Como se puede observar en la Figura 45, en los pacientes del sexo femenino se encontró una representación de todos los subtipos secuenciados, descubriendo una mayor prevalencia de los subtipos ST2 (37,5%; 6/16) y ST4 (31,3%; 5/16), seguidos de los subtipos ST1 y ST6 (ambos con un 12,5%; 2/16), y, en menor porcentaje, el ST3 (6,3%; 1/16). En contraposición, los pacientes del sexo masculino presentaron solamente tres de los cinco subtipos analizados, siendo el subtipo con mayor prevalencia el ST3 (57,1%; 4/7), seguido de los subtipos ST1 (28,6%; 2/7) y ST2 (14,3%; 1/7). En este caso no se halló la presencia de los subtipos ST4 ni ST6.

En la Figura 46 se muestran los perfiles de subtipos y alelos detectados en las secuencias de los pacientes estudiados en función del sexo, quedando patente una mayor diversidad genética del protista en el sexo femenino, aunque no fue estadísticamente significativa.

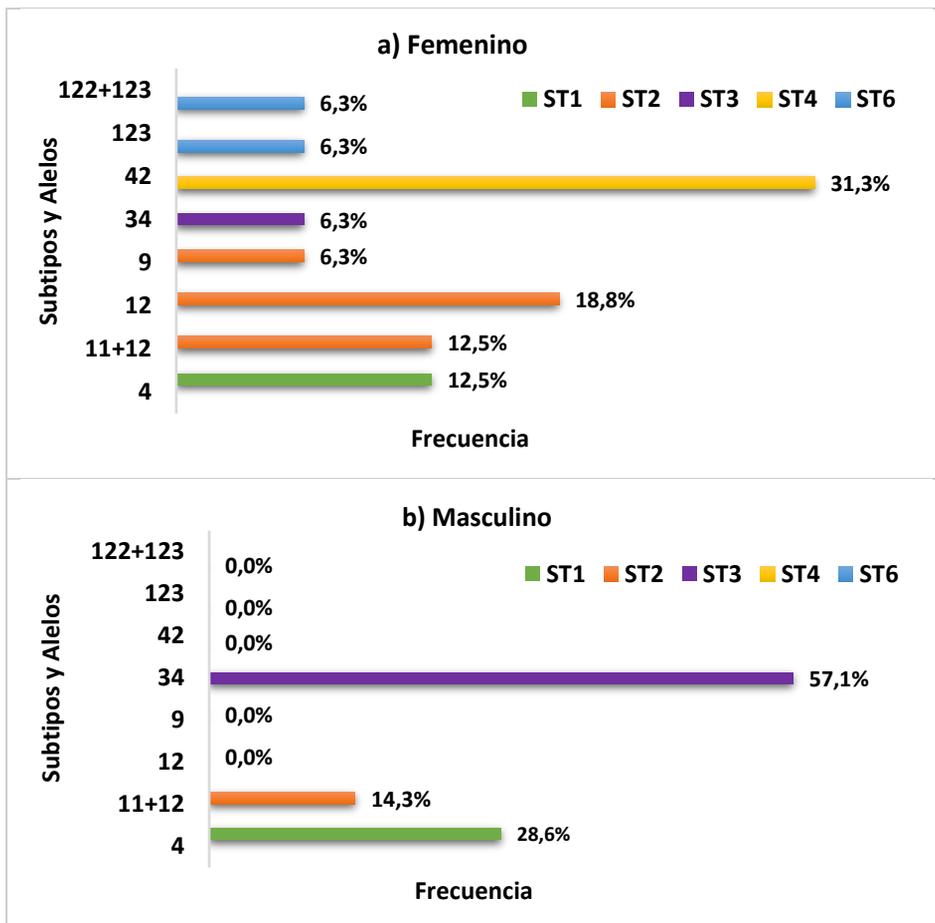


Figura 46. Diversidad y frecuencia de los ST y alelos de *Blastocystis* en función del sexo: a) Femenino y b) Masculino.

En los pacientes del sexo femenino (Figura 46, a) destaca la presencia de todos los casos de los subtipos ST4 (alelo 42; 31,3%) y ST6 (alelos 123 y 122+123; 6,3% cada uno), además de los casos de ST2 con los alelos 9 (6,3%), 12 (18,8%) y la mayor parte de casos con el alelo 11+12 (12,5%). Todos ellos con los correspondientes SNPs ya mencionados en el apartado anterior. En el caso de los pacientes del sexo masculino (Figura 46, b) solamente destaca la presencia de la mayor parte de casos del subtipo

Resultados

ST3 (alelo 34; 57,1%), del subtipo ST1 (alelo 4; 28,6%) y del subtipo ST2 con alelo 11+12 (14,3%) con el SNP A168R.

4.2.2. Distribución de subtipos en función de la edad

De las 29 muestras de DNA positivas para *Blastocystis* sp. mediante PCR convencional, dos muestras pertenecían a los pacientes con rangos de edad de 0 a 9 años, ocho eran de pacientes entre 20-30 años, doce en el rango de 31 a 50 años y, por último, siete indicaban ser a los mayores de 50 años. En la Figura 47 se muestra la distribución de casos secuenciados en función de los diferentes grupos de edad.

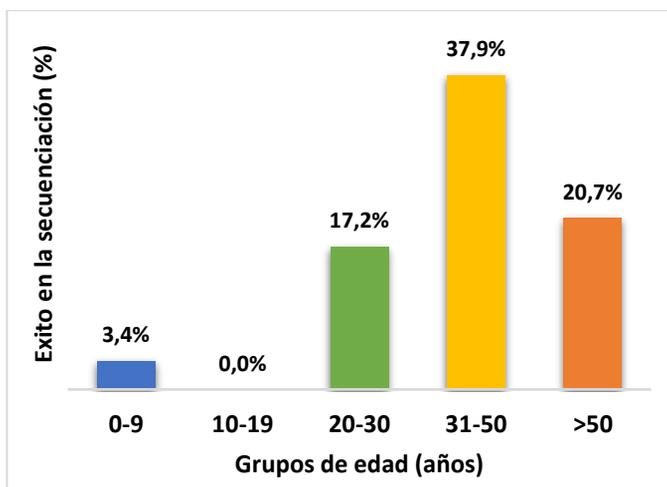


Figura 47. Resultados obtenidos en la secuenciación de *Blastocystis* en función de los grupos de edad.

Al analizar las secuencias obtenidas en función del grupo de edad, se encontraron diferencias en la frecuencia de parasitación de los subtipos descritos (Figura 48), aunque no fueron estadísticamente significativas.

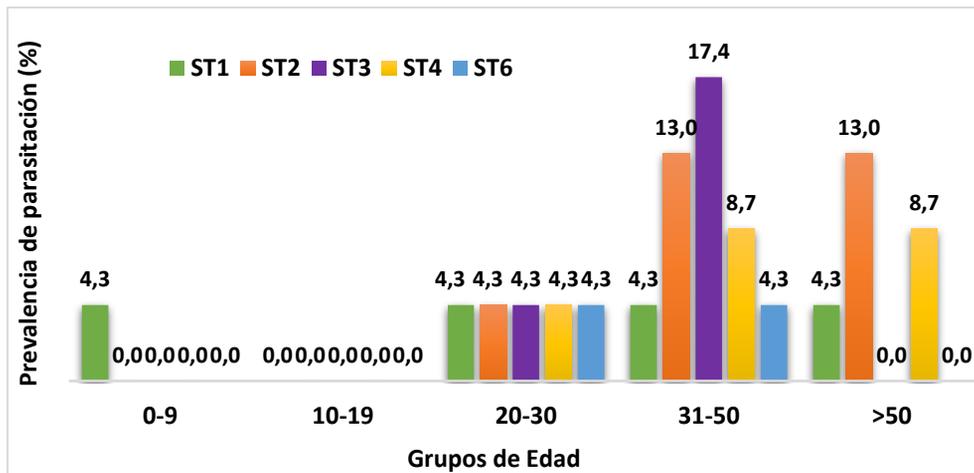


Figura 48. Prevalencia de los ST de *Blastocystis* según el grupo de edad.

Como se puede observar en la Figura 48, los pacientes del grupo de edad entre los 31 y 50 años presentaron una mayor variabilidad genética de *Blastocystis*, siendo el subtipo más prevalente el ST3 (17,4%; 4/23), seguido del ST2 (13,0%; 3/23), el ST4 (8,7%; 2/23), y, por último, los subtipos ST1 y ST6 con porcentajes del 4,3% (1/23) cada uno. El segundo con mayor variabilidad genética fue el grupo de edad entre los 20 y 30 años, que presentó todos los subtipos encontrados, pero en menores porcentajes en comparación con el grupo anterior, con valores de cada subtipo del 4,3% (1/23) (Figura 48). El grupo de los pacientes mayores de 50 años presentaron prevalencias del ST2 del 13,0% (3/23), que fue seguido por el ST4 (8,7%; 2/23) y ST1 (4,3%; 1/23), no hallando la presencia de ST3 ni ST6 (Figura 48). En el caso del grupo de pacientes entre los 0 y 9 años solamente se encontró el ST1 en uno de los pacientes (4,3%) y en el grupo con edades comprendidas entre los 10 y 19 años no se halló la presencia de *Blastocystis* mediante PCR y, por lo tanto, no se obtuvo ningún subtipo (Figura 48).

La Figura 49 muestra la variabilidad genética de las secuencias analizadas que corresponden al grupo de edad con edades comprendidas entre los 31 y 50 años. En

Resultados

este grupo destaca la mayor presencia del ST3 con el Alelo 34 (17,4%), seguido del ST2 con los Alelos 9, 12 y 11+12 (4,3% cada uno), con los SNPs A168R y A250W en el Alelo 12 y el A168R en el Alelo 11+12, y, por último, el ST6 con el Alelo 123 (4,3%).

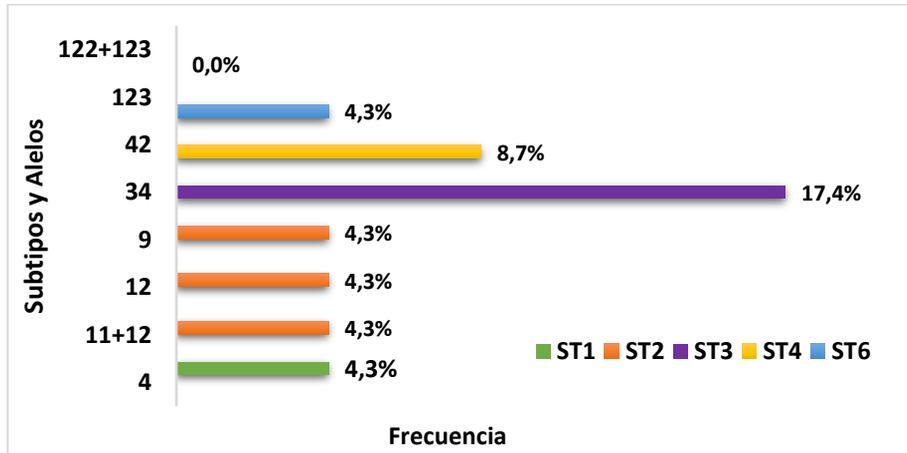


Figura 49. Diversidad y frecuencia de los ST de *Blastocystis* sp. identificados en los pacientes con edades entre los 30 y 51 años.

La Figura 50 muestra la variabilidad genética de las secuencias analizadas del grupo de edad de entre los 20 y 30 años, destacando la presencia del Alelo 11+12 del ST2 con la sustitución A74R (4,3%), y la presencia del Alelo 122+123 del ST6 con la sustitución A64R (4,3%).

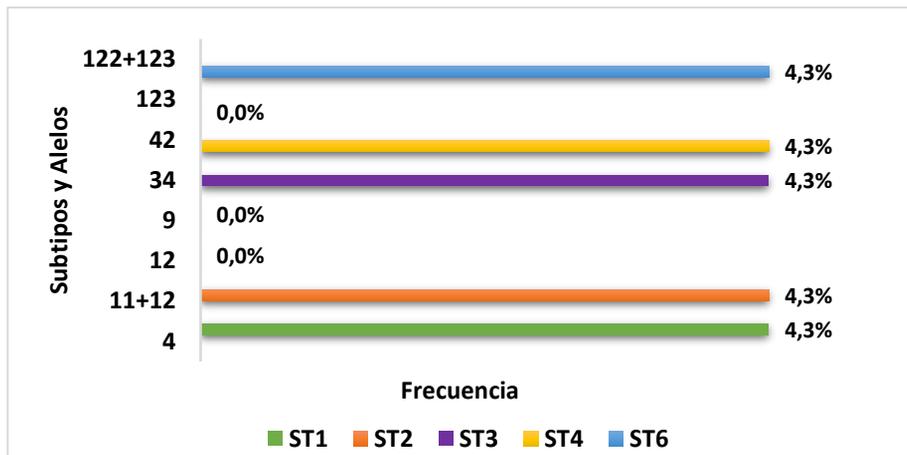


Figura 50. Diversidad y frecuencia de los ST de *Blastocystis* sp. identificados en los pacientes con edades entre los 20 y 30 años.

La Figura 51 muestra la variabilidad genética de las secuencias analizadas de los pacientes mayores de 50 años, destacando la presencia del alelo 11+12 del ST2 con el SNPs A74R (4,3%), además de una mayor presencia del Alelo 12 del ST2 (8,7%).

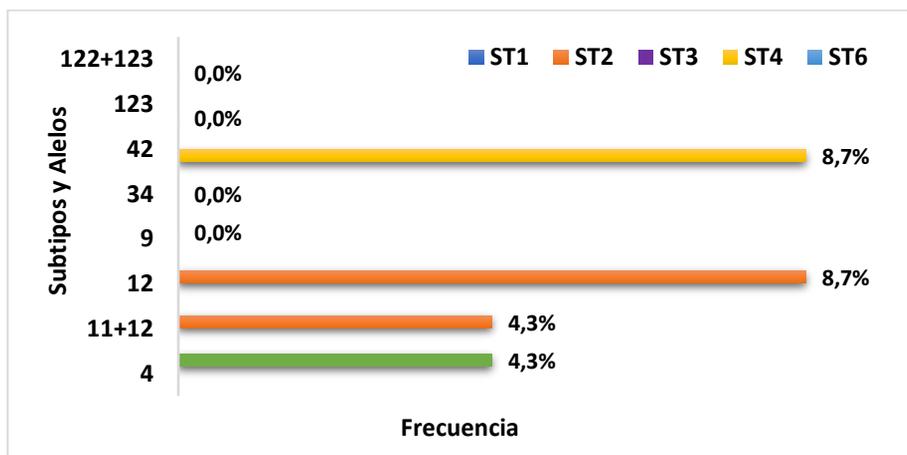


Figura 51. Diversidad y frecuencia de los ST de *Blastocystis* sp. identificados en los pacientes con edades superiores a los 50 años.

5. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-TGC Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

A continuación, se analiza la asociación entre la presencia de los parásitos intestinales en la población y los diferentes TGC y patologías estudiadas, tanto gastrointestinales como extraintestinales, para identificar si la infección parasitaria es capaz de originar o agravar la condición.

5.1. En función del estado parasitario

La presencia de parásitos intestinales en la población de estudio en función de las patologías que presentaban se puede observar en las Tablas 28 y 29, donde se muestran los casos de pacientes con TGC y otras patologías gastrointestinales (Tabla 28), y extraintestinales (Tabla 29). Los pacientes que no aportaron el diagnóstico médico correspondiente para cada patología no fueron considerados al realizar el análisis estadístico.

En la Tabla 28 se puede observar que existe una mayor presencia de las patologías consideradas en los pacientes del grupo P, que en los del grupo NP. El TGC más prevalente en ambos casos fue la Intolerancia/malabsorción a carbohidratos, donde los pacientes del grupo P presentaron una frecuencia superior (58,7%) a los pacientes del grupo NP (25,5%), aunque la diferencia no fue significativa. En ambos grupos, destaca una mayor prevalencia de la IF con un 53,9% en el grupo P y un 23,0% en el NP, seguido de la IL (41,4% y 15,9%, respectivamente).

Tabla 28. Prevalencias de TGC y otras patologías intestinales según el estado parasitario

Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)	Grupo P		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Intolerancia/Malabsorción a carbohidratos (n=235)	138	58,7	60	25,5	0,476
Lactosa (n=232)	96	41,4	37	15,9	0,161
Fructosa (n=230)	124	53,9	53	23,0	0,248
Síndrome de Intestino Irritable (n=242)	42	17,4	17	7,0	0,740
Enfermedad Celíaca (n=164)	40	24,4	25	15,2	0,438
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (n=252)	18	7,1	7	2,8	0,710
Enfermedad de Crohn (n=252)	5	2,0	3	1,2	1
Colitis Ulcerosa (n=252)	13	5,2	4	1,6	0,534
Gastritis (n=271)	53	19,6	21	7,7	0,461
Otras patologías gastrointestinales	n	%	n	%	p-valor
Sobrecrecimiento bacteriano (n=102)	46	45,1	21	20,6	0,191
<i>H. pylori</i> (n=220)	42	19,1	22	10,0	1
Otras patologías (n=294)	44	15,0	12	4,1	0,357

Como se puede observar en la Figura 52, en los casos de malabsorción a carbohidratos la prevalencia fue muy superior en los pacientes parasitados en comparación con los no parasitados, aun así, la asociación entre las variables estudiadas no fue significativa (Potencia estadística (PE) = 99%).

El siguiente TGC más frecuente en la población de estudio fue la EC, con mayor porcentaje de casos en el grupo parasitado (24,4%) frente al no parasitado (15,2%). Seguido de la Gastritis crónica, con un 19,6% de pacientes en el Grupo P y un 7,7% en el NP. Continuando con el SII, con porcentajes similares del 17,4% en el grupo P y del 7,0% en el NP. Y, por último, la EII con valores del 7,1% en el grupo P y 2,8% en el NP, diferenciando la CU (5,2% y 1,6%, respectivamente), seguida de la E. Cr con prevalencias mucho menores (2,0% y 1,2%, respectivamente). En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas (PE = 99%).

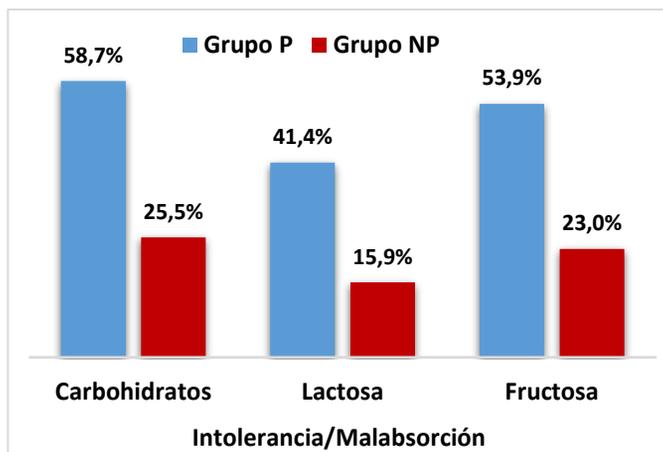


Figura 52. Prevalencias de las intolerancias/malabsorpciones a carbohidratos.

En cuanto a otras patologías gastrointestinales consideradas en el estudio, no se encontró significancia estadística al comparar entre el estado parasitológico y el resto de las patologías estudiadas (Tabla 28). Aun así, se dio una mayor concentración de casos en el caso del SIBO, con porcentajes del 45,1% en el grupo P y del 20,6% en el grupo NP. Seguido por la infección por *H. pylori* con prevalencias mayores en el grupo P (19,1%) que en el grupo NP (10,0%). Y, por último, la presencia de otras patologías de interés con porcentajes del 15,0% y 4,1%, respectivamente.

Enfermedades extraintestinales	Grupo P		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Otras enfermedades autoinmunes (n=289)	58	20,1	21	7,3	0,184
Alergias (n=268)	54	20,1	36	13,4	0,225

Respecto a la presencia de enfermedades extraintestinales en la población de estudio, la Tabla 29 muestra una mayor prevalencia en el caso de los pacientes parasitados que en los pacientes no parasitados, sin diferencias significativas entre las variables (PE = 99%).

Aun así, la patología con mayor porcentaje de casos en ambos grupos fue la presencia de alergias, presentando porcentajes del 20,1% en el grupo P frente al 13,4% del grupo NP, seguido de la presencia de enfermedades autoinmunes con porcentajes del 20,1% y 7,3%, respectivamente.

5.2. En función de la parasitación por *G. intestinalis*

Las prevalencias de las patologías gastrointestinales estudiadas en función de la parasitación por *G. intestinalis* se muestran en la Tabla 30. En general, se observa una mayor distribución de pacientes afectados por los diferentes TGC y otras patologías en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* (*Giardia*) en comparación con los pacientes no parasitados (Grupo NP).

Tabla 30. Prevalencias de TGC y otras patologías gastrointestinales según la parasitación por <i>G. intestinalis</i>					
Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)	<i>Giardia</i>		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Intolerancia/malabsorción a carbohidratos (n=222)	128	57,7	60	27,0	0,392
Lactosa (n=220)	88	40,0	37	16,8	0,190
Fructosa (n=217)	116	53,5	53	24,4	0,154
Síndrome de Intestino Irritable (n=232)	41	17,7	17	7,3	0,628
Enfermedad Celíaca (n=157)	37	23,6	25	15,9	0,416
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (n=237)	17	7,2	7	3,0	0,673
Enfermedad de Crohn (n=237)	4	1,7	3	1,3	0,975
Colitis Ulcerosa (n=239)	13	5,4	4	1,7	0,437
Gastritis (n=256)	45	17,6	21	8,2	0,721
Otras patologías gastrointestinales	n	%	n	%	p-valor
Sobrecrecimiento bacteriano (n=95)	41	43,2	21	22,1	0,169
<i>H. pylori</i> (n=206)	41	19,9	22	10,7	0,967
Otras patologías (n=279)	39	14,0	12	4,3	0,089

Resultados

El TGC con mayor distribución de casos tanto en el grupo de parasitados por *G. intestinalis* como en el de no parasitados sigue siendo la intolerancia/malabsorción a carbohidratos (57,7% y 27,0%, respectivamente). En la Figura 53, se pueden observar los porcentajes de casos de las diferentes intolerancias/malabsorciones estudiadas para ambos grupos, siendo muy superiores en aquellos pacientes parasitados por *G. intestinalis*.

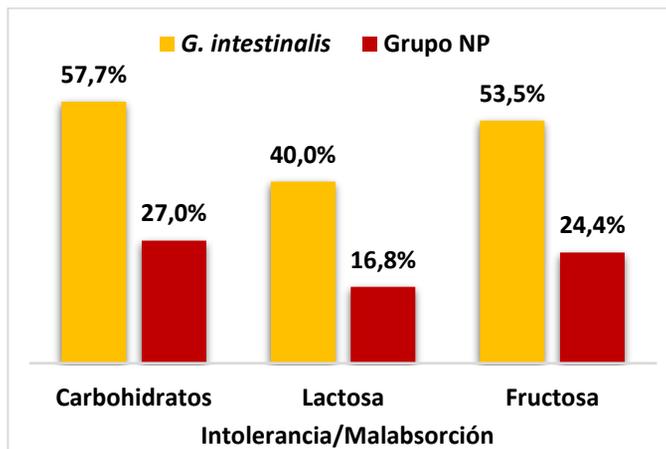


Figura 53. Prevalencias de las intolerancias/malabsorciones presentes en los pacientes con *G. intestinalis* y el grupo NP.

El resto de TGC presentaron una distribución de casos inferiores (Tabla 30), destacando a la EC, con un 23,6% en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* y un 15,9% en los no parasitados, el SII (17,7% vs. 7,3%, respectivamente) y, con valores similares, la gastritis (17,6% vs. 8,2%, respectivamente).

En lo referente a otras patologías gastrointestinales, los porcentajes de casos también fueron superiores en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* que en los NP (Tabla 30), destacando la presencia de SIBO con porcentajes del 43,2% frente al 22,1%, respectivamente.

Tabla 31. Prevalencias de enfermedades extraintestinales según la parasitación por *G. intestinalis*

Enfermedades extraintestinales	<i>Giardia</i>		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Otras enfermedades autoinmunes (n=274)	52	19,0	21	7,7	0,243
Alergias (n=253)	46	18,2	36	14,2	0,070

En el caso de las patologías extraintestinales (Tabla 31), se siguió el mismo patrón, destacando la mayor presencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes parasitados (19,0%) frente a los no parasitados (7,7%).

Sin embargo, en ningún caso se halló una asociación significativa entre la presencia un TGC o patología concreta y la parasitación por el protozoo (PE=98–99%).

5.2.1. En función del genotipo y subgenotipo de *G. intestinalis*

Debido a la baja frecuencia de pacientes parasitados por el genotipo B de *G. intestinalis* en la población de estudio (2/295) se descartaron los datos correspondientes a dichos pacientes, no pudiendo conocer si existen diferencias entre el subgenotipo A y B en cuanto a la posible asociación con TGC u otras patologías gastrointestinales y/o extraintestinales.

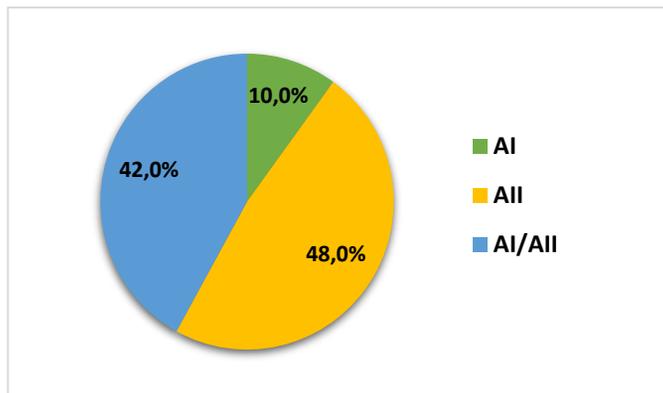


Figura 54. Subgenotipos presentes en la población parasitada por el genotipo A de *G. intestinalis*.

No obstante, se realizó el análisis estadístico de los pacientes parasitados por los diferentes subgenotipos del genotipo A del protozoo ($n=50$) para intentar identificar una posible asociación entre la presencia de los diferentes subgenotipos y de las patologías estudiadas. No obstante, debido a la baja prevalencia de los casos de AI (10,0%; 5/50) y a la elevada prevalencia del subgenotipo ambiguo AI/AII (42,0%; 21/50), con porcentajes similares al AII (48,0%; 24/50) (Figura 54), la potencia estadística del análisis fue baja (27-33%) y los resultados no fueron concluyentes, por lo que sería necesario un mayor número de casos o porcentajes más elevados de secuenciación con subgenotipos conocidos para determinar la posible asociación entre las variables.

5.3. En función de la parasitación por *Blastocystis* sp.

Las patologías gastrointestinales y extraintestinales más frecuentes observadas en función de la parasitación por *Blastocystis* sp. pueden observarse en la Tabla 32 y Tabla 33.

Tabla 32. Prevalencias de TGC y otras patologías gastrointestinales según la parasitación por <i>Blastocystis</i> sp.					
Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)	<i>Blastocystis</i>		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Intolerancia/malabsorción a carbohidratos (n=104)	27	26,0	60	57,7	0,411
Lactosa (n=103)	21	20,4	37	35,9	0,048*
Fructosa (n=102)	23	22,5	53	52,0	0,405
Síndrome de Intestino Irritable (n=103)	7	6,8	17	16,5	0,912
Enfermedad Celíaca (n=80)	7	8,8	25	31,3	0,296
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (n=114)	2	1,8	7	6,1	1
Enfermedad de Crohn (n=114)	1	0,9	3	2,6	1
Colitis Ulcerosa (n=114)	1	0,9	4	3,5	1
Gastritis (n=124)	13	10,5	21	16,9	0,244
Otras patologías gastrointestinales	n	%	n	%	p-valor
Sobrecrecimiento bacteriano (n=44)	13	29,5	21	47,7	1
<i>H. pylori</i> (n=104)	6	5,8	22	21,2	0,442
Otras patologías (n=136)	11	8,1	12	8,8	0,128

*Diferencia estadísticamente significativa entre parasitados por *Blastocystis* y no parasitados.

Como se resume en las tablas mencionadas, en el caso de los pacientes parasitados por el protista (*Blastocystis*) se halló una menor distribución de casos, tanto en los TGC como en las otras patologías gastrointestinales y extraintestinales estudiadas, en comparación con los pacientes no parasitados (Grupo NP). Esto puede ser debido al bajo número de casos de pacientes parasitados por *Blastocystis* sp. (n=39) o también sería posible que la presencia del protista no se encuentre relacionada con el desarrollo de las patologías estudiadas o a que su patogenicidad se deba a diferentes factores dependientes del hospedador, del microambiente intestinal, etc.

Como en el resto de los análisis, los TGC más frecuentes fueron las intolerancias/malabsorciones a carbohidratos (Tabla 32), sin embargo, en este caso, la distribución de casos fue superior en el grupo de pacientes no parasitados (57,7%) frente al grupo de parasitados por *Blastocystis* (26,0%).

Resultados

En la figura 55 se muestran las prevalencias de las diferentes intolerancias/malabsorciones a carbohidratos en los grupos de pacientes parasitados por *Blastocystis* sp. y de no parasitados, observándose mayores porcentajes en los NP. Esto sugiere que en el grupo de pacientes no parasitados las intolerancias/malabsorciones se deban a otras causas diferentes del protista.

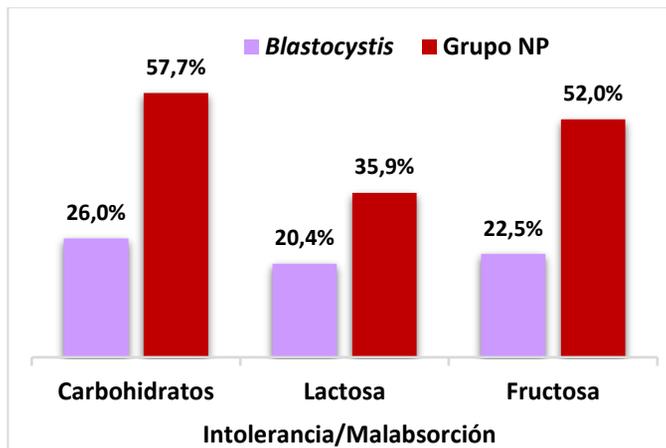


Figura 55. Prevalencias de las intolerancias/malabsorciones presentes en los pacientes parasitados por *Blastocystis* sp. y en los NP.

Al analizar la relación entre las variables: parasitación por *Blastocystis* sp. y presencia de intolerancia/malabsorción a fructosa y lactosa, se halló una asociación significativa entre la presencia de IL y la parasitación por el protista (p -valor = 0,048; OR = 2,60; IC 95% = 0,96-7,70; Cramer's = 0,203), observándose una probabilidad 2,6 veces superior de que se desarrolle la IL en los pacientes parasitados (PE = 78-85%).

El resto de TGC presentaron una distribución de casos inferior en comparación con las intolerancias/malabsorciones (Tabla 32), enfatizando la baja distribución de casos parasitados por *Blastocystis* en el caso de patologías como el SII (6,8%) o EII (1,8%).

Respecto a las otras patologías gastrointestinales estudiadas (Tabla 32) destaca el mayor porcentaje de casos en el SIBO en ambos grupos, con porcentajes superiores en los pacientes no parasitados (47,7%) en comparación con los parasitados por *Blastocystis* (29,5%).

En el caso de las patologías extraintestinales (Tabla 33), se observa el mismo patrón, con un número de casos superior en los pacientes que no presentaron infección parasitaria.

Enfermedades extraintestinales	<i>Blastocystis</i>		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Otras enfermedades autoinmunes (n=132)	13	9,8	21	15,9	0,149
Alergias (n=110)	11	10,0	36	32,7	0,478

Tras el análisis estadístico entre el resto de patologías estudiadas, tanto TGC como las otras patologías gastrointestinales o extraintestinales, y el estado de parasitación por *Blastocystis*, en ningún caso se demostró una relación significativa (PE = 78-85%), no pudiendo demostrar que el parásito sea el causante de las mismas.

5.3.1. En función del subtipo de *Blastocystis sp.*

Debido al bajo nivel de parasitación por *Blastocystis sp.* (39/295) y al bajo éxito de subtipado posterior (23/39), la distribución de casos de las patologías estudiadas por cada subtipo fue bajo. Aun así, se realizó el análisis estadístico de todas las variables según el subtipo para intentar identificar una posible asociación con cada patología.

A modo de recordatorio, en la Figura 56 se muestran los porcentajes de parasitación por cada subtipo en la población de estudio, siendo el más prevalente el ST2 (30,4%;

Resultados

7/23), seguido de los subtipos ST3 y ST4 (21,7%; 5/23), ST1 (17,4%; 4/23) y, por último, ST6 (8,7%; 2/23).

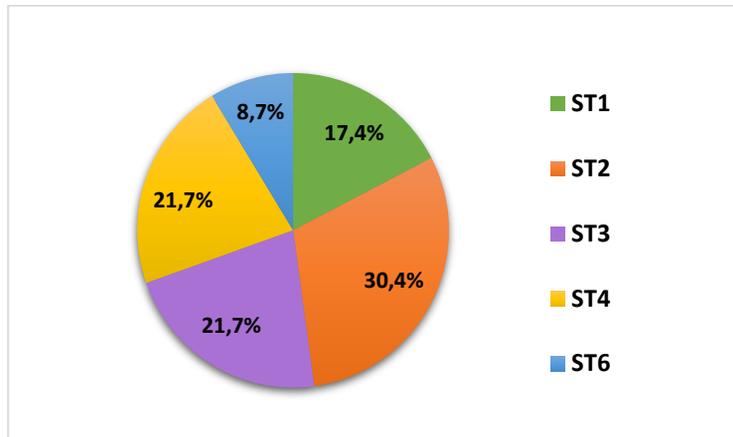


Figura 56. Distribución de los ST de *Blastocystis* entre la población de estudio (n=23).

La distribución de casos de las patologías gastrointestinales y extraintestinales estudiadas en función de los diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. pueden observarse en las Tablas 34 y 35. Debido al bajo número de pacientes agrupados en cada subtipo de *Blastocystis* el número de casos para cada TGC y otras patologías gastrointestinales fueron muy inferiores a las obtenidas en el análisis de la parasitación general por *Blastocystis* (Tabla 34). Aun así, en el caso de los pacientes con TGC destaca una mayor concentración de casos con presencia del subtipo ST2 en los pacientes con intolerancia/malabsorción a carbohidratos (16,7%), con énfasis en la IF (17,9%) y continuando con la IL (13,8%), además de en los pacientes con gastritis (8,3%) y SII (7,4%). El subtipo ST4, es el único subtipo presente en los pacientes con EC parasitados por *Blastocystis* (12,5%). Por último, el único subtipo presente en pacientes con EII fue el ST1 (6,7%), donde se encontró una asociación significativa pese a la baja cantidad de casos entre ambas variables (p -valor=0,016). Sin embargo, debido a la baja potencia estadística del test (15-18%) no se podría

asegurar que dicha asociación sea real. Para comprobar que ocurre esta tendencia sería necesario un mayor tamaño muestral de pacientes parasitados por los diferentes subtipos de *Blastocystis*.

Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC)	ST1		ST2		ST3		ST4		ST6		p-valor
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Intolerancia/malabsorción a carbohidratos (n=30)	3	10,0	5	16,7	4	13,3	3	10,0	1	3,3	0,343
Lactosa (n=29)	2	6,9	4	13,8	3	10,3	3	10,3	1	3,5	0,649
Fructosa (n=28)	2	7,4	5	17,9	4	14,3	3	10,7	1	3,6	0,268
Síndrome de Intestino Irritable (n=27)	1	3,7	2	7,4	0	0,0	1	3,7	1	3,7	0,852
Enfermedad Celíaca (n=24)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	12,5	0	0,0	0,058
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (n=30)	2	6,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,016*
Enfermedad de Crohn (n=30)	1	3,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,242
Colitis Ulcerosa (n=30)	1	3,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,242
Gastritis (n=36)	1	2,8	3	8,3	2	5,6	1	2,8	0	0,0	0,831
Otras patologías gastrointestinales	n	%	p-valor								
Sobrecrecimiento bacteriano (n=17)	1	5,9	4	23,5	1	5,9	2	11,8	1	5,9	0,797
<i>H. pylori</i> (n=30)	0	0,0	1	3,3	0	0,0	0	0,0	1	3,3	0,346
Otras patologías (n=38)	1	2,6	2	5,1	1	2,6	2	5,1	0	0,0	0,926

*Asociación estadísticamente significativa entre un ST y una patología.

Respecto a las otras patologías gastrointestinales estudiadas (Tabla 34), se observa un mayor número de casos con SIBO (23,5%) en los parasitados por el ST2, sin destacar la presencia de otros subtipos en las otras patologías.

Resultados

Con la excepción de la asociación encontrada entre la presencia del ST1 y la EII, tras el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes patologías y la presencia de subtipos concretos de *Blastocystis* sp.

En cuanto a las patologías extraintestinales (Tabla 35), solamente destaca la presencia del subtipo ST2 en pacientes con enfermedades autoinmunes (8,3%) y alergias (5,6%). Como se esperaba, el análisis estadístico tampoco rebeló una asociación significativa entre las variables.

Tabla 35. Distribución de casos de enfermedades extraintestinales en función del subtipo de *Blastocystis*

Enfermedades extraintestinales	ST1		ST2		ST3		ST4		ST6		p-valor
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Otras enfermedades autoinmunes (n=36)	2	5,6	3	8,3	1	2,8	1	2,8	1	2,8	0,713
Alergias (n=36)	1	2,8	2	5,6	1	2,8	0	0,0	0	0,0	0,911

Como se ha mencionado anteriormente, la potencia estadística de los resultados para conocer la asociación entre los subtipos del parásito y los TGC y el resto de las patologías estudiadas en relación con el tamaño muestral (n=39) se encuentra entre un 15–18%, porcentajes incluso inferiores que en el caso de los subgenotipos de *G. intestinalis*. Existiendo probabilidades del 82–85% de no encontrar la asociación entre las variables deseada debido al pequeño tamaño muestral.

6. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-SINTOMATOLOGÍA

En el siguiente apartado, se analiza la posible asociación entre las infecciones parasitarias y la sintomatología, gastrointestinal y extraintestinal.

6.1. En función del estado parasitario

La sintomatología gastrointestinal y extraintestinal que presenta la población de estudio en función del estado de parasitación se muestra en las Figuras 57 y 58.

En la Figura 57 se muestra que, en general, la sintomatología gastrointestinal está presente en un mayor porcentaje de casos en el grupo de pacientes parasitados (Grupo P), siendo los valores muy superiores en comparación con el grupo de pacientes no parasitados (Grupo NP).

Los síntomas gastrointestinales más prevalentes fueron el dolor abdominal (62,4% en el grupo P en comparación con el 28,8% del grupo NP), flatulencias (59,0 vs. 30,5%), distensión abdominal (56,6 vs. 28,8%), la presencia de grasa en heces (46,4 vs. 19,7%), la presencia de dispepsia (35,6 vs. 18,0%) y diarrea (33,6 vs. 18,0%), entre otra sintomatología con menor presencia. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se observó una asociación significativa entre el las variables estar parasitado y la sintomatología estudiada (Figura 57) (PE = 99%).

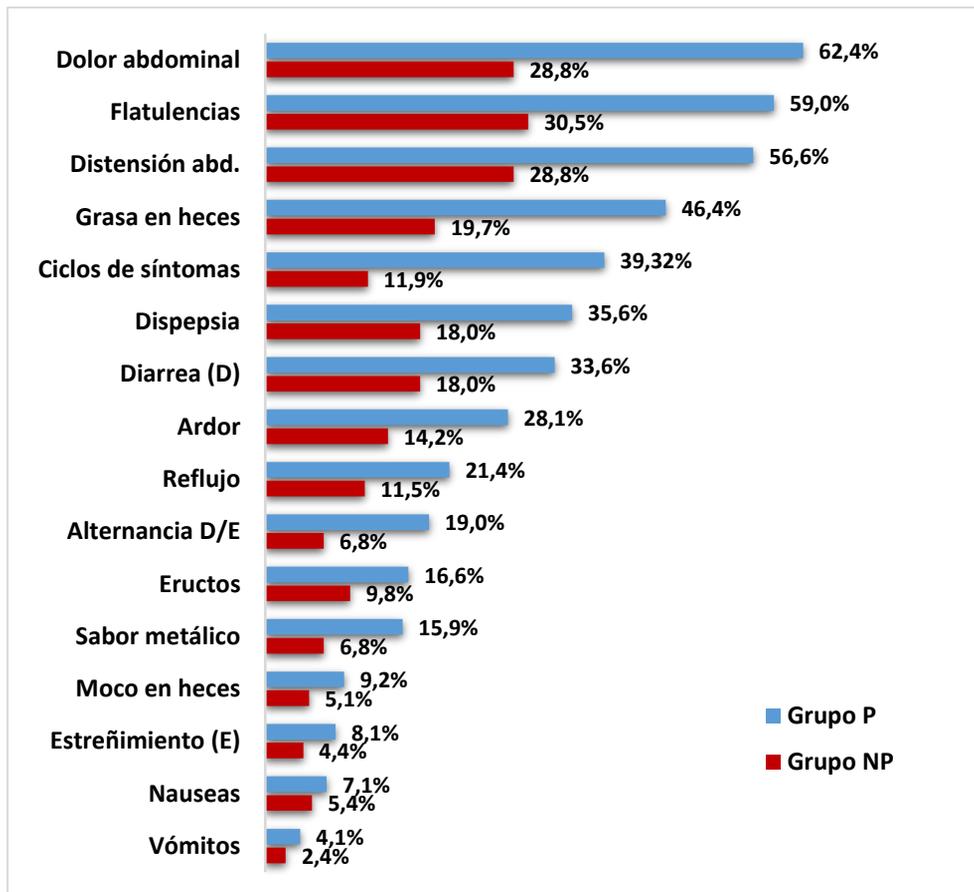


Figura 57. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados (grupo P) y no parasitados (grupo NP). abd.: abdominal.

La frecuencia de deposiciones diarias en ambos grupos fue similar, con valores de 2,27 deposiciones al día en el grupo P y de 2,17 en el grupo NP, con desviaciones estándar de 1,44 y 1,32, respectivamente, sin encontrar diferencias estadísticas significativas entre las variables (PE = 99%).

Sin embargo, cabe destacar que se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de sintomatología cíclica (síntomas gastrointestinales exacerbados en periodos concretos de tiempo alternados con cierta normalidad) y

la infección parasitaria (p -valor = 0,0002; OR = 2,57; IC 95% = 1,52-4,40; Cramer = 0,22), lo que implica una probabilidad 2,57 veces superior de sufrir esta condición si el paciente se encuentra parasitado (PE = 99%).

Respecto a la sintomatología extraintestinal, existe una mayor presencia de estas condiciones en los pacientes del grupo P frente a los pacientes del grupo NP (Figura 58), como ocurre en el caso de los TGC y otras patologías gastrointestinales.

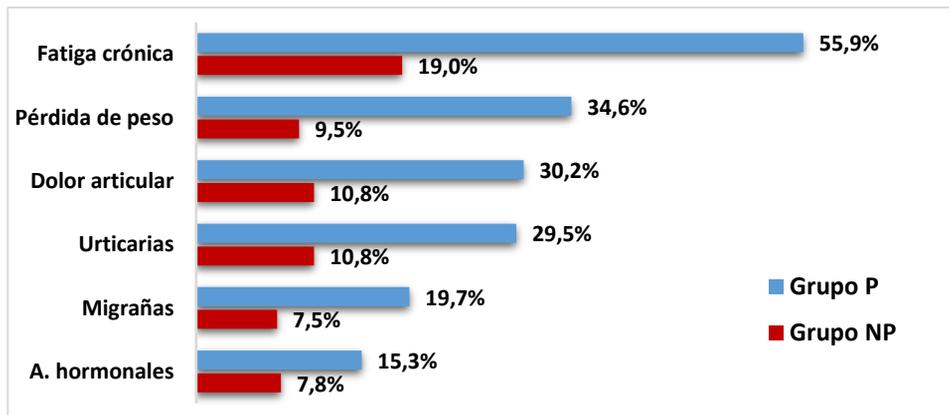


Figura 58. Prevalencia de los diferentes síntomas extraintestinales presentes en los pacientes de los grupos P y NP.

Al realizar el análisis estadístico de las múltiples variables, se descubrió una asociación significativa entre los síntomas más prevalentes y el estado parasitario, por lo que la probabilidad de padecer la siguiente sintomatología es mayor si el paciente se encuentra parasitado: fatiga crónica (p -valor = 1,65e-06; OR = 3,85; IC 95% = 2,15-6,97; Cramer = 0,29), pérdida de peso acusada (p -valor = 0,0002; OR = 2,68; IC 95% = 1,55-4,70; Cramer = 0,22) y dolor articular (p -valor = 0,045; OR = 1,70; IC 95% = 0,99-2,93; Cramer = 0,12) (PE = 99%).

6.2. En función de la parasitación por *G. intestinalis*

La presencia de la sintomatología estudiada, tanto gastrointestinal como extraintestinal, en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* (*Giardia*) en comparación con los no parasitados (Grupo NP) puede observarse en las Figuras 59 y 60.

En la Figura 59, se puede observar que la sintomatología gastrointestinal, en general, se presenta en un mayor número de casos de pacientes parasitados por *G. intestinalis* en comparación con los pacientes no parasitados. Los síntomas más frecuentes en ambos grupos fueron el dolor abdominal (60,7% en los pacientes parasitados frente al 30,4% de los NP), flatulencias (57,1 vs. 32,1%), distensión abdominal (55,0 vs. 30,4%), presencia de grasa en heces (45,7 vs. 20,7%), entre otros, como ocurría con el total de pacientes parasitados y no parasitados.

Tras realizar el análisis estadístico para conocer la relación entre las variables parasitado por *G. intestinalis* y presencia de cada síntoma gastrointestinal no se obtuvo una asociación significativa, excepto en el caso de la presencia de sintomatología cíclica (p -valor = 0,00016; OR = 2,70; IC 95% = 1,57-4,62; Cramer's = 0,23), siendo 2,7 veces más probable que aparezca esta condición en los pacientes con giardiosis (PE = 98-99%).

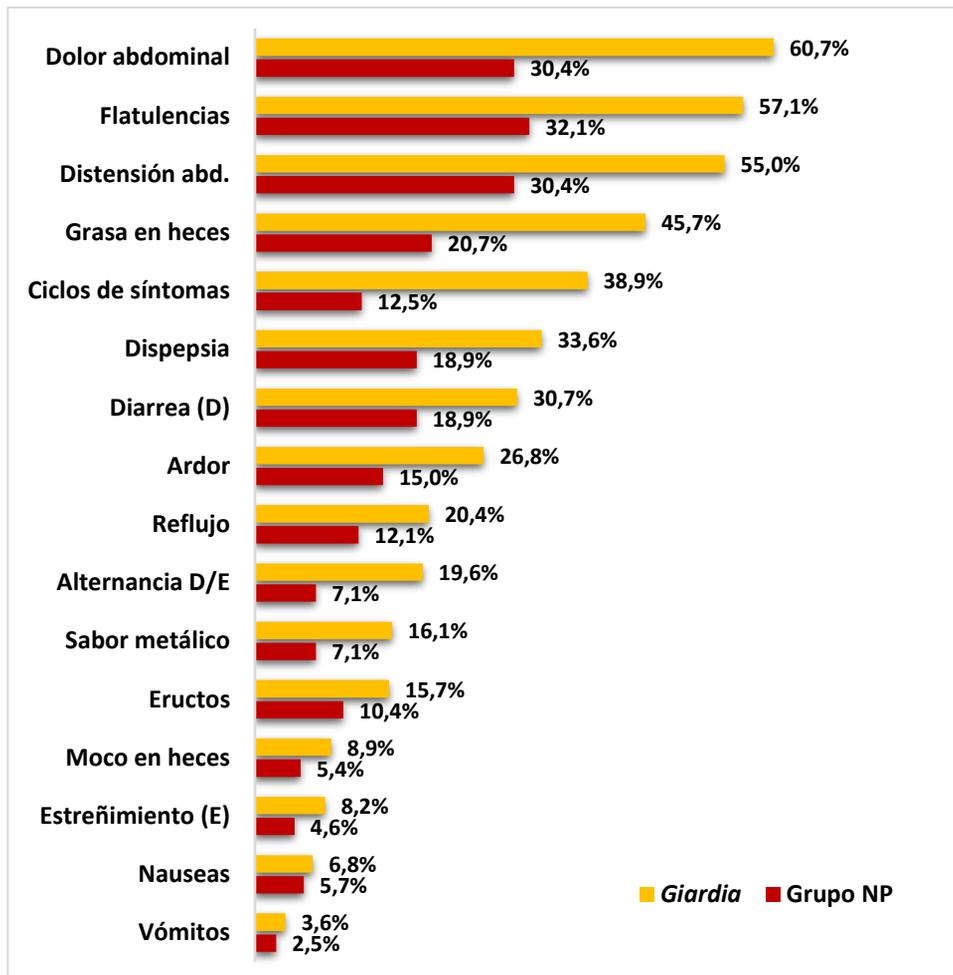


Figura 59. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* y los no parasitados (grupo NP). abd.: abdominal.

La media de frecuencia de deposiciones diaria fue similar en los pacientes positivos por *G. intestinalis* y en los NP, con valores medios de 2,22 y 2,17 deposiciones al día respectivamente, y desviaciones estándar de 1,32 y 1,44, no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los grupos.

Resultados

Respecto a la sintomatología extraintestinal, ocurre de igual manera que en la sintomatología gastrointestinal, los pacientes parasitados por el protozoo presentan una distribución de casos mucho mayor en todos los casos en comparación con el grupo NP (Figura 60).

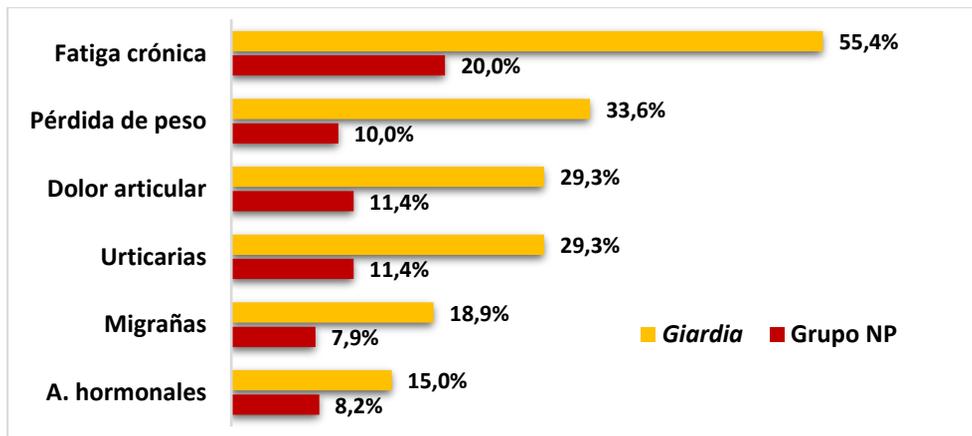


Figura 60. Prevalencia de los diferentes síntomas extraintestinales presentes en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* y los NP. A. hormonales: alteraciones hormonales.

Al realizar el análisis estadístico entre las variables: presencia de sintomatología extraintestinal y parasitación por *G. intestinalis*, se obtuvo una asociación significativa en el caso de la fatiga crónica, la pérdida de peso, el dolor articular y la presencia de urticarias. La fatiga o cansancio crónico fue el síntoma extraintestinal que se asoció con mayor fuerza (Test de Cramer = 0,3) con la presencia del parásito (p-valor = 4,65e-07; OR = 4,3; IC 95% = 2,34-7,95), contando con una probabilidad 4,3 veces superior en pacientes infectados por *G. intestinalis* que en los no parasitados. Continuando con la presencia de una asociación entre el estar parasitado por el protozoo y la pérdida acusada de peso (p-valor = 0,00024; OR = 2,7; IC 95% = 1,53-4,70; Cramer = 0,22), siendo la presencia de esta condición 2,7 veces superior en los pacientes con giardiosis que en los NP. Además, se observó

una asociación entre el dolor articular con la presencia del protozoo, siendo 1,7 veces más probable en estos pacientes que en los no parasitados (p -valor = 0,05; OR = 1,7; IC 95% = 0,98-2,93; Cramer = 0,12). Y, por último, también se halló una pequeña asociación (Cramer = 0,12) entre la infección por el protozoo y la presencia de urticarias recidivantes de origen no alérgico, localizadas en extremidades en la mayoría de los casos (p -valor = 0,05; OR = 1,7; IC 95% = 0,98-2,93), siendo esta condición 1,7 veces superior en los pacientes parasitados que en los NP. (PE = 98% - 99%).

La presencia de los síntomas que han resultado significativos en el análisis estadístico: fatiga crónica, pérdida de peso acusada, dolor articular, urticarias y presencia de sintomatología cíclica, son característicos de la infección por *G. intestinalis* y podrían orientar al personal sanitario en la práctica clínica para la sospecha de la giardiosis.

6.2.1. En función del genotipo y subgenotipo de *G. intestinalis*

Al igual que en el punto 5.2.1. de la presente tesis doctoral, se descartó la participación de los 2 pacientes parasitados por el genotipo B de *G. intestinalis* en el análisis estadístico, siendo imposible conocer la presencia de diferencias entre los 2 genotipos hallados en la población de estudio. No obstante, se realizó el análisis estadístico de los pacientes parasitados por los diferentes subgenotipos del genotipo A, para comprobar si existe una asociación entre ellos y la presencia de sintomatología gastrointestinal y/o extraintestinal.

En la Figura 61 se muestra la distribución de casos con presencia de sintomatología gastrointestinal en función de los diferentes subgenotipos del genotipo A de *G.*

Resultados

intestinalis (n=50). En general se observa una mayor prevalencia de sintomatología gastrointestinal en los pacientes parasitados por el subgenotipo All (Figura 61), siendo los síntomas predominantes el dolor abdominal (44,0%), la distensión abdominal y flatulencias (40,0%), presencia de grasa en heces (34,0%) y dispepsia (32,0%), entre otros. Los síntomas más frecuentes en el caso del subgenotipo ambiguo Al/All fueron los mismos que en el caso del All, pero con porcentajes ligeramente inferiores: dolor abdominal (38,0%), distensión abdominal (36,0%), flatulencias (34,0%) y presencia de grasa en heces (30,0%), destacando, en contraposición, prevalencias ligeramente superiores en la presencia de diarrea (24,0% en el Al/All frente al 16,0% en el All), eructos (10,0 vs. 4,0%) y náuseas (4,0 vs. 2,0%). En el caso del subgenotipo Al, las prevalencias fueron muy inferiores al resto debido al bajo número de casos (n=5). Respecto a la presencia de sintomatología cíclica se observó una mayor frecuencia en los pacientes parasitados por el subgenotipo All (32,0%), seguido del Al/All (22,0%) y, en menor porcentaje, el Al (2,0%) (Figura 61).

Aun observando a simple vista las diferencias en la presencia de sintomatología gastrointestinal en los pacientes parasitados por los diferentes subgenotipos, el análisis estadístico no reveló ninguna asociación significativa entre las variables.

La media de frecuencia de deposiciones diaria fue similar en los pacientes con los subgenotipos All y Al/All de *G. intestinalis*, con valores medios de 2,16 deposiciones al día en los pacientes con All y de 2,25 en el Al/All, con desviaciones estándar de 0,93 y 1,19 respectivamente. En el caso de los pacientes parasitados con el subgenotipo Al, la media de deposiciones diarias fue de 1,7, con una desviación estándar de 1,4, menor al resto de los subgenotipos. En ningún grupo se obtuvieron diferencias significativas.

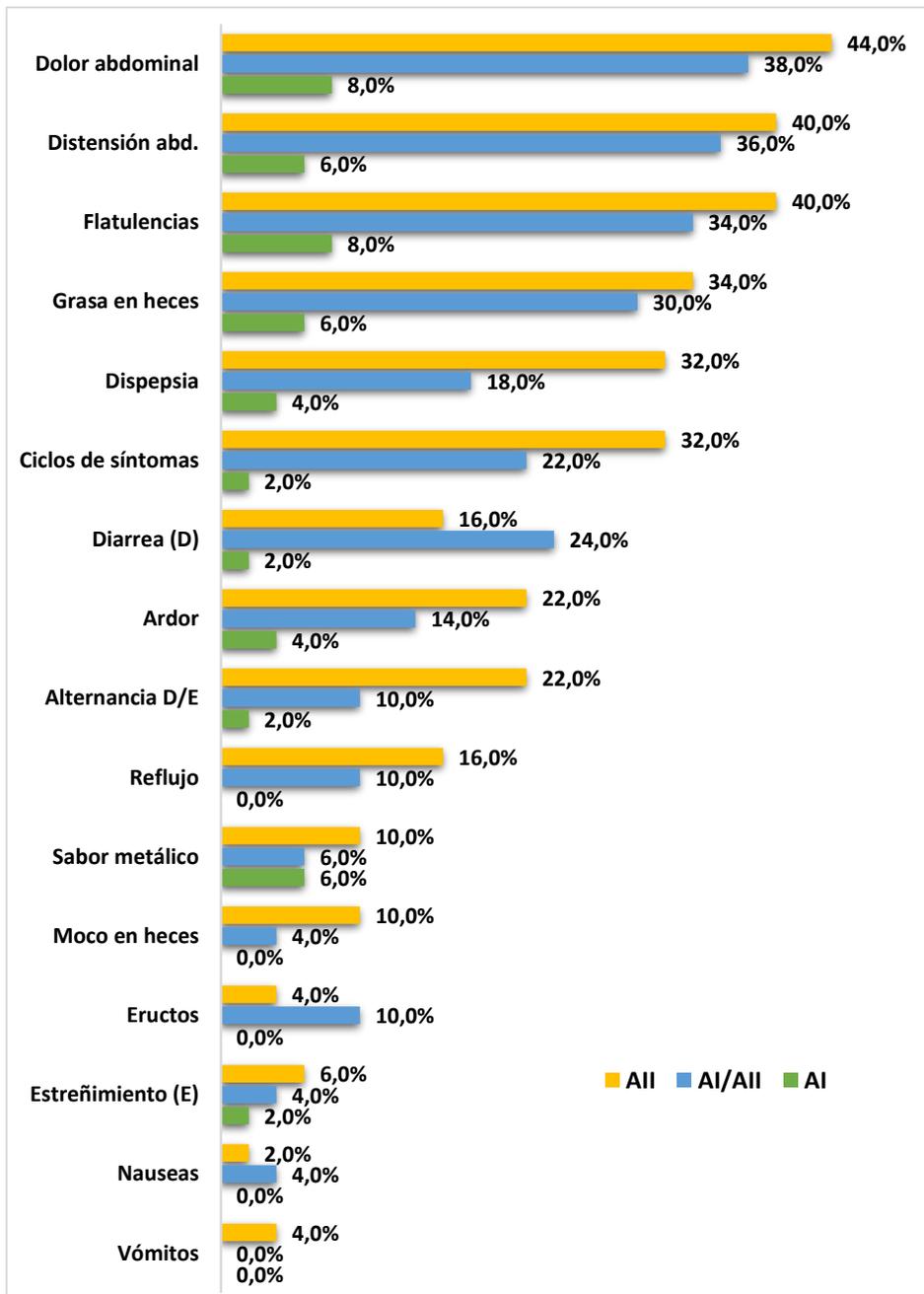


Figura 61. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal en la población de estudio según el subgenotipo de *G. intestinalis*. abd.: abdominal.

Resultados

En la Figura 62 se puede observar la distribución de casos con sintomatología extraintestinal en función de los subgenotipos de *G. intestinalis*, encontrando un patrón similar al caso de la sintomatología gastrointestinal entre los diferentes subgenotipos identificados, con porcentajes superiores, en general, en los casos parasitados por el subgenotipo AII, seguido por aquellos parasitados con el AI/AII y, por último, por el AI.

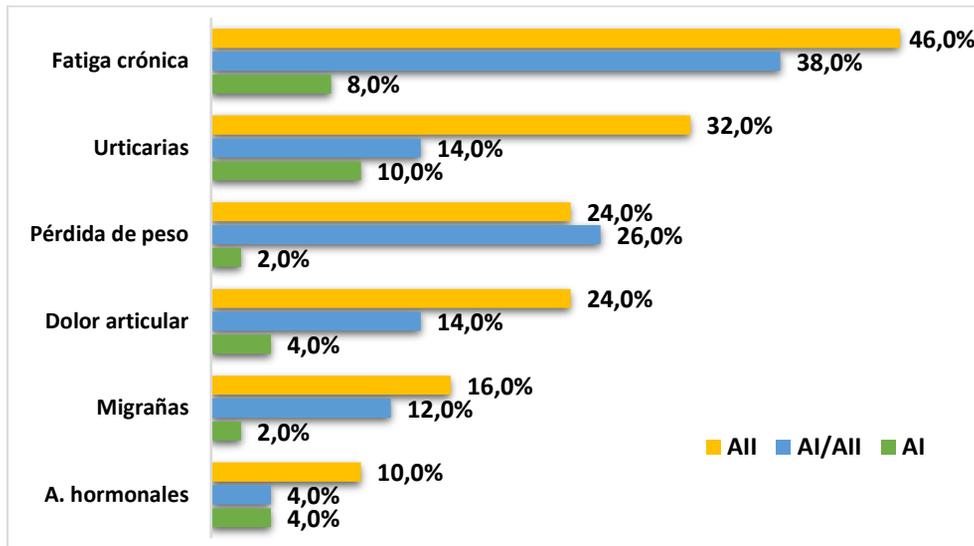


Figura 62. Prevalencia de los síntomas extraintestinales presentes en la población de estudio según el subgenotipo de *G. intestinalis*. A. hormonales: Alteraciones hormonales.

Tras el análisis estadístico de las variables no se obtuvo una asociación estadística significativa entre la mayoría de síntomas y la parasitación por un subgenotipo concreto, exceptuando en el caso de la presencia de urticarias, hallando diferencias significativas entre los subgenotipos AII (p-valor = 0,001) y AI/AII (p-valor = 0,004) respecto al subgenotipo AI, pero no entre los subgenotipos AII y AI/AII. Aun así, debido a la baja potencia estadística del test (27–33%) no se podría asegurar que la asociación obtenida entre e los subgenotipos AII y AI/AII y el síntoma urticarias sea

real. Para ello, se necesitarían obtener resultados de secuenciación más elevados entre la población parasitada por *G. intestinalis* y disponer de un mayor número de pacientes que portaran cada subgenotipo.

6.3. En función de la parasitación por *Blastocystis* sp.

En el caso de la parasitación por *Blastocystis* sp. en relación con la sintomatología descrita (Figuras 63 y 64), se puede observar una distribución de casos superior en el caso del grupo NP en comparación con los parasitados por el protista (*Blastocystis*), como ocurre en el análisis de los TGC y patologías asociadas.

En la Figura 63 se muestran los porcentajes de los pacientes que presentan los diferentes síntomas gastrointestinales en función de la parasitación por *Blastocystis* y la ausencia de parasitación (Grupo NP). Los síntomas con mayor prevalencia en ambos grupos fueron las flatulencias (65,7% en los pacientes NP frente al 27,0% de los parasitados por *Blastocystis*), dolor abdominal (62,0 vs. 27,7%), distensión abdominal (62,0 vs. 22,6%), presencia de grasa en heces (42,3 vs. 18,2%) y diarrea (38,7 vs. 19,7%), entre otros.

Tras el análisis estadístico, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de variables, no pudiendo asociar la infección parasitaria por *Blastocystis* con la presencia de los síntomas gastrointestinales estudiados, con la excepción de la presencia de sintomatología cíclica, en la que se encontró una asociación en el límite de significación, siendo esta 2,1 veces más probable en los pacientes parasitados por el protista que en los pacientes NP (p-valor = 0,056; OR = 2,1; IC 95% = 0,92-4,8; Cramer's = 0,12) (PE = 78–85%).

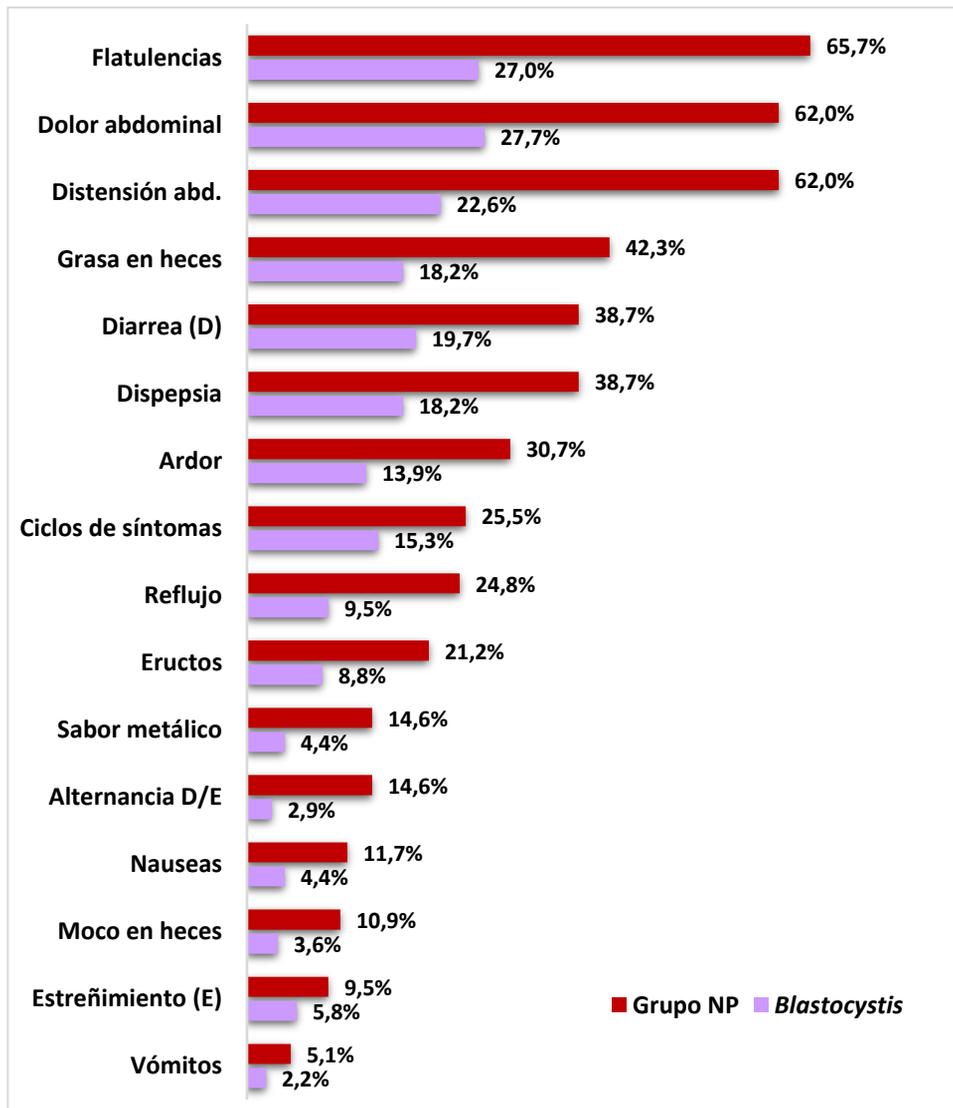


Figura 63. Prevalencia de la sintomatología gastrointestinal presente en los pacientes parasitados por *Blastocystis* y los NP. abd.: abdominal.

La media de la frecuencia de deposiciones diaria fue similar en los pacientes positivos y negativos de *Blastocystis* sp., con valores de 2,36 deposiciones al día en los pacientes parasitados y de 2,17 en los NP, con desviaciones estándar de 1,44 y

1,32, respectivamente. En este caso tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las variables.

Respecto a la sintomatología extraintestinal presente en la población de estudio (Figura 64), se observó un patrón similar que en el caso de la sintomatología gastrointestinal, donde la distribución de casos de los pacientes no parasitados fue mucho mayor que la de pacientes parasitados por *Blastocystis*.

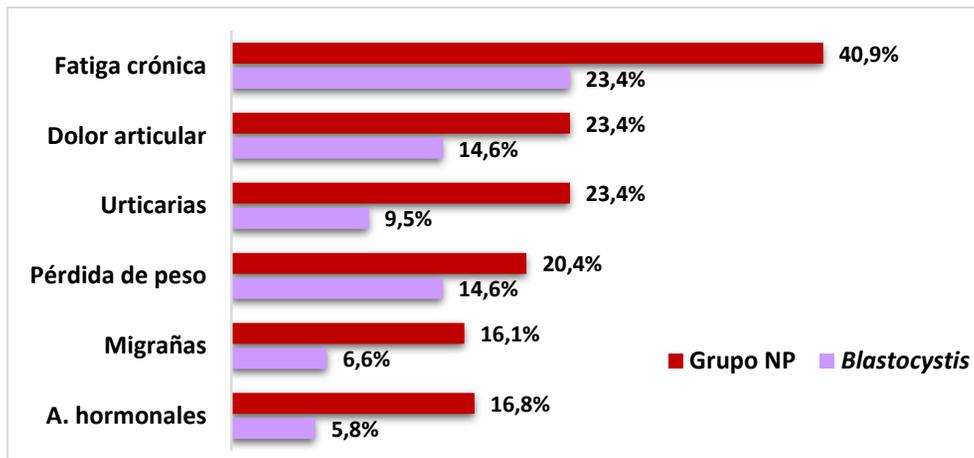


Figura 64. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en los pacientes parasitados por *Blastocystis* y los no parasitados (grupo NP). A. hormonales:

Al realizar el análisis estadístico de las variables: parasitación por *Blastocystis* y la presencia de la sintomatología extraintestinal, se revelaron diferencias significativas en los siguientes síntomas: Fatiga crónica, asociándose de forma significativa con la presencia de *Blastocystis* con una probabilidad 3,4 veces superior en comparación con la ausencia de parasitación (p-valor = 0,006; OR = 3,4; IC 95% = 1,31-10,03; Cramer's = 0,235). Dolor articular (p-valor = 0,05; OR = 2,15; IC 95% = 0,95-4,95; Cramer = 0,122), cuya asociación con el protista fue 2,15 veces superior en comparación con el grupo no parasitado. Y, por último, la pérdida de peso (p-valor

= 0,017; OR = 2,61; IC 95% = 1,14-6,06; Cramer = 0,215), que se dio 2,61 veces más en los pacientes parasitados que en los no parasitados (PE = 78–85%).

6.3.1. En función del subtipo de *Blastocystis* sp.

Las prevalencias de la sintomatología estudiada en relación con la parasitación por los diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. se puede observar en las Figuras 65, 66 y 67.

La sintomatología intestinal presente en los pacientes parasitados por cada subtipo se muestra en la Figura 65, destacando una mayor distribución de casos parasitados por el ST2 en la sintomatología en general, siendo los síntomas con mayores porcentajes, el dolor abdominal y flatulencias (18,0% cada uno), distensión abdominal (12,8%) y diarrea (10,3%). Los siguientes subtipos con mayor número de casos entre los diferentes síntomas fueron el ST3 y ST4, con porcentajes inferiores en comparación con el subtipo ST2 y sin destacar su presencia en pacientes con una sintomatología concreta. A continuación, se encontró una menor distribución de casos parasitados con el subtipo ST1 y, por último, el ST6. La presencia de sintomatología cíclica fue mayor en aquellos pacientes parasitados por los subtipos ST2 y ST1 (10,3%) (Figura 65).

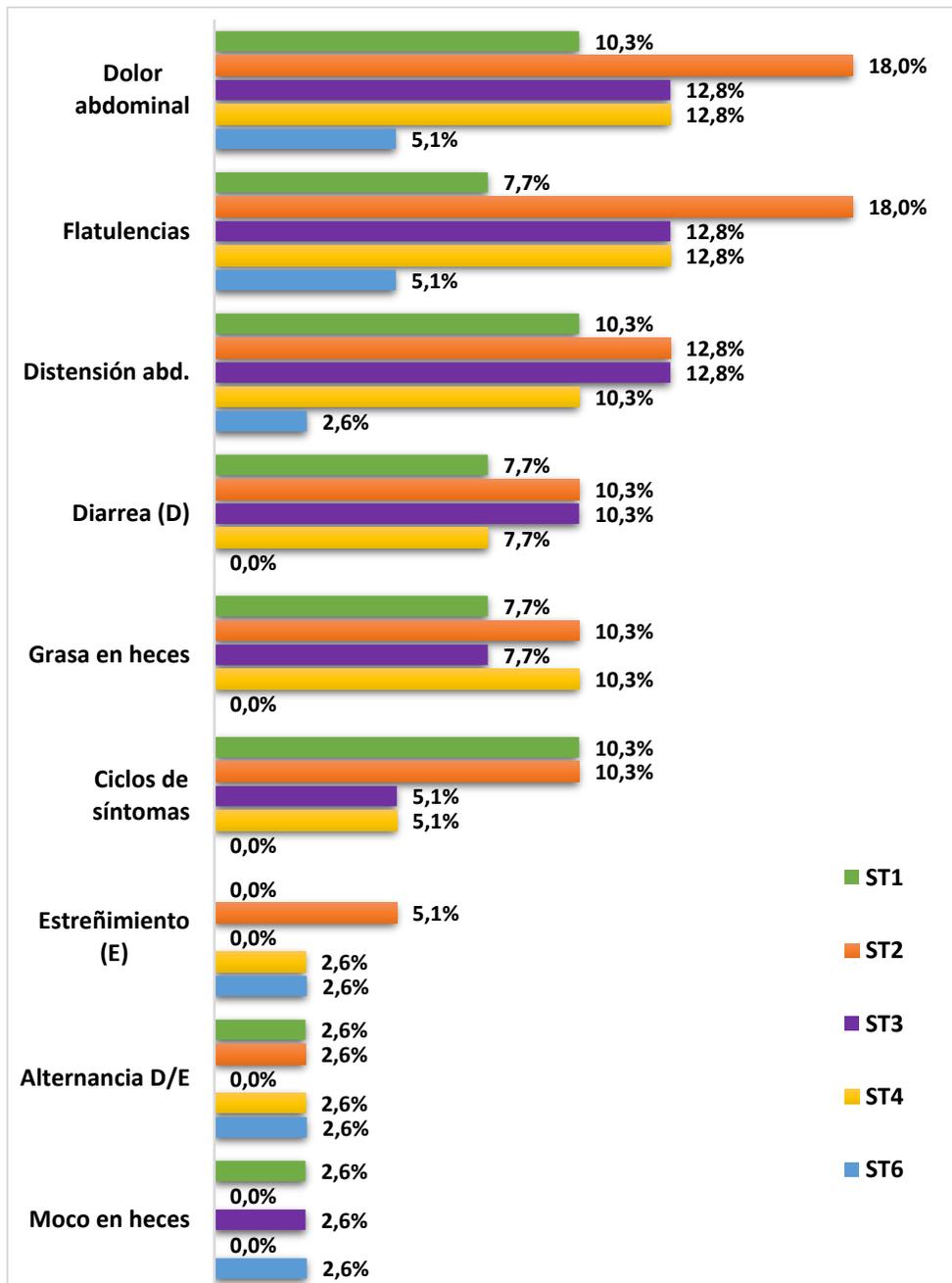


Figura 65. Prevalencia de la sintomatología intestinal presente en la población de estudio según el subtipo (ST) de *Blastocystis sp.*

Resultados

En ningún caso se encontró una asociación estadísticamente significativa entre un subtipo concreto del parásito y la presencia de sintomatología intestinal, para ello sería necesario conseguir una potencia estadística mayor (15–18%) aportando un mayor número de pacientes parasitados por cada subtipo.

En cuanto a la media de la frecuencia de deposiciones diarias fue similar en todos los casos, con valores de 1,96 deposiciones al día en los pacientes parasitados por el ST2 (DE=1,18), 1,90 en el ST3 (DE=1,34) y 2,45 en el ST4 (DE=1,42), con la excepción de una media de 4 deposiciones diarias en el caso del ST1 (DE=1,41). El subtipo ST6 no se incluyó en el análisis estadístico debido al bajo porcentaje de parasitación. En ningún caso los resultados fueron relevantes al realizar el análisis estadístico.

En el caso de la sintomatología gástrica (Figura 66), las prevalencias siguen el mismo patrón, encontrando una distribución de casos superior del subtipo ST2 en sintomatología como dispepsia (15,4%) y ardor (10,3%). Sin embargo, en el caso del síntoma sabor metálico se observó un mayor número de casos del ST3 (5,1%) y los vómitos solamente se dieron en pacientes parasitados por el ST3 y ST6 (2,6%). En ningún caso se obtuvieron resultados estadísticamente significativos que destacaran una asociación entre las variables.

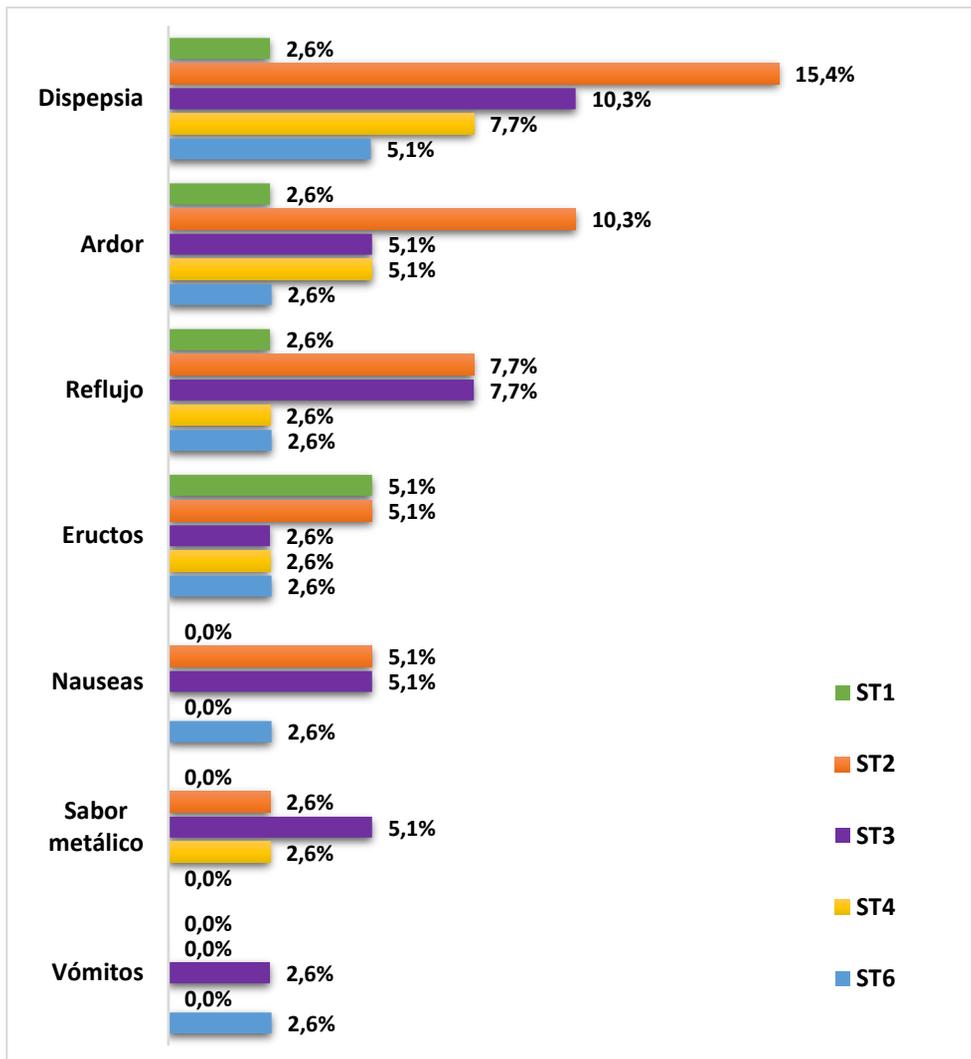


Figura 66. Prevalencia de la sintomatología gástrica presente en la población de estudio según el subtipo (ST) de *Blastocystis* sp.

Respecto a la sintomatología extraintestinal (Figura 67), el ST2 siguió destacando con un número superior de casos en todos los síntomas, destacando en la presencia de una pérdida de peso acusada (12,8%), urticarias (10,3%) y fatiga crónica o cansancio (12,8%), en esta última se encontró el mismo porcentaje en aquellos pacientes

Resultados

parasitados por el ST3. El siguiente subtipo con mayor distribución de casos fue el ST4, con porcentajes inferiores al ST2 en todos los casos.

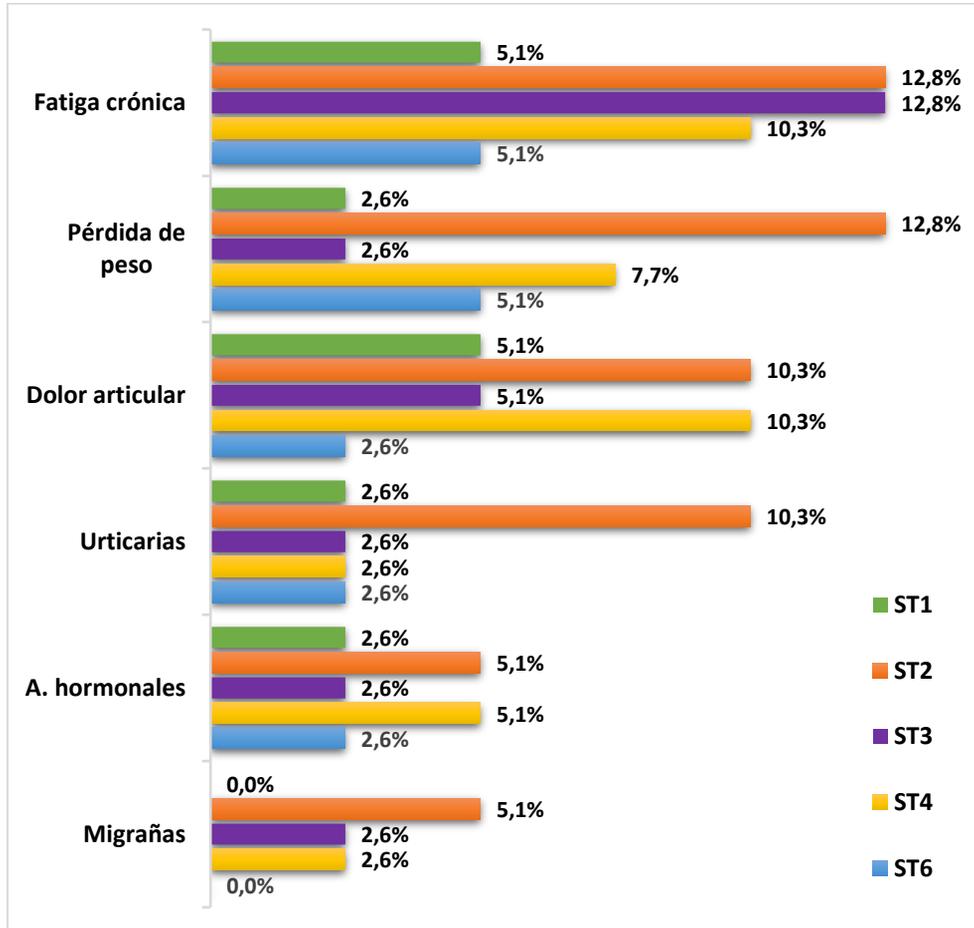


Figura 67. Prevalencia de la sintomatología extraintestinal presente en la población de estudio según el subtipo (ST) de *Blastocystis* sp. A. hormonales: alteraciones hormonales.

No obstante, tampoco se pudo demostrar mediante el análisis estadístico una asociación entre la infección por subtipos concretos y la sintomatología extraintestinal.

7. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE PARÁSITOS INTESTINALES

A continuación, se detallan los factores de riesgo de una posible parasitación por los protistas estudiados en la población de estudio y se analiza estadísticamente la relación entre las diferentes variables.

Los factores hacen referencia al propio estilo de vida y/o hábitos de los pacientes que puedan aumentar las probabilidades de una existente infección parasitaria. Entre ellos se incluye una profesión de riesgo (aquella con contacto directo con personas o animales, y/o sus fluidos biológicos), consumo de frutas y verduras de cultivo ecológico (alimentación ecológica), contacto frecuente con animales, viajes a países endémicos, contacto habitual con niños y/o discapacitados y el tratamiento crónico con omeprazol.

La prevalencia de los diferentes factores de riesgo según el estado parasitológico de todos los pacientes de estudio se muestra en la Tabla 36. Los pacientes que no aportaron la información necesaria fueron descartados en el análisis de las diferentes variables.

Tras el análisis estadístico de todas las variables respecto a la presencia o ausencia de parásitos intestinales se determinó que el único factor de riesgo en el que se apreció una pequeña asociación significativa fue el contacto habitual de los pacientes estudiados con niños y/o discapacitados (p -valor = 0,019; OR = 2,43; IC95% = 1,14-5,43; Cramer = 0,185), por lo que estar en contacto frecuente con estas personas aumenta la probabilidad en 2,43 veces de adquirir una infección parasitaria intestinal (PE = 99%).

Factores de Riesgo	Grupo P		Grupo NP		p-valor
	n	%	n	%	
Profesión de riesgo (n=103)	41	39,8	9	8,7	0,917
Alimentación ecológica (n=127)	15	11,8	2	1,6	0,149
Agua no embotellada (n=75)	6	8,0	0	0,0	1
Contacto con animales (n=80)	43	53,8	11	13,8	0,091
Viajes a países endémicos (n=154)	37	24,0	18	11,7	1
Contacto niños/discapacitados (n=179)	50	27,9	13	7,3	0,019*
Omeprazol crónico (n=284)	28	9,9	11	3,9	0,713

*Diferencia estadísticamente significativa entre parasitados y no parasitados.

Al realizar el análisis estadístico entre los múltiples factores de riesgo y la presencia de infección en función de la especie parásita, solamente se observó una asociación significativa en aquellos pacientes parasitados por *G. intestinalis* con contacto frecuente con niños o personas discapacitadas (p-valor=0,018; OR=2,4; IC95%=1,10-5,33; Cramer=0,163), por lo que el contacto frecuente con estos grupos de población aumenta la probabilidad en 2,4 veces de adquirir una infección parasitaria producida por *G. intestinalis* (PE = 98-99%).

En cuanto al análisis de la asociación entre la parasitación por *Blastocystis* sp. y sus subtipos y los diferentes riesgos parasitológicos, no se obtuvo ningún resultado estadísticamente significativo, debido, seguramente, a la baja frecuencia de parasitación de la población de estudio por el protista.

V. DISCUSIÓN

1. FRECUENCIA DE PARASITACIÓN Y ESPECTRO DE ESPECIES

Uno de los objetivos de la tesis doctoral consistía en determinar la prevalencia de parasitación intestinal en los 295 pacientes incluidos con TGC u otras patologías y/o sintomatología intestinal y/o extraintestinal crónica. Para ello, se realizó el análisis parasitológico mediante los diferentes métodos diagnósticos descritos obteniendo una prevalencia de parasitación total del 67% (197/295), porcentaje de pacientes que formarían parte del grupo P o pacientes parasitados. Este resultado demuestra la elevada tasa de parasitosis intestinales no diagnosticadas en población con problemas gastrointestinales crónicos.

Comparando los datos con la literatura científica se puede observar que el resultado obtenido es muy superior a los mostrados en estudios publicados. Por ejemplo, el grupo de Zdero y colaboradores (1997) obtuvo una prevalencia de parasitación del 28,6% en los 185 pacientes con presencia diarrea y/o TGC. Conviene recalcar que en dicho estudio se emplearon solamente métodos coprológicos mediante microscopía, sin contar con técnicas de diagnóstico inmunológico o biología molecular, lo que daría lugar a una menor detección parasitaria. Ocurre lo mismo en el estudio del año 2002 realizado por Bujanda y colaboradores en Guatemala en el que participaron 59 pacientes con trastornos funcionales digestivos como el SII, síndrome dispéptico, etc. donde se obtuvo una prevalencia de parasitación del 22%, resultado similar al estudio realizado por Zdero y colaboradores (1997) debido a que utilizaron métodos diagnósticos similares.

Otro estudio más reciente realizado por Trelis y colaboradores (2019) en pacientes de la Comunidad Valenciana con sintomatología gastrointestinal crónica compatible

Discusión

con intolerancia/malabsorción a los carbohidratos lactosa y fructosa obtuvo prevalencias de parasitación del 42%, porcentaje más elevado que los mostrados en los dos estudios anteriores pero inferior al obtenido en este estudio. En este caso, los métodos parasitológicos fueron similares a los empleados en la presente tesis doctoral, exceptuando la aplicación de técnicas moleculares, lo que explicaría el aumento de la sensibilidad en la detección parasitaria.

En cuanto al espectro de especies parásitas halladas en la población estudiada, encontramos más frecuentemente a protistas intestinales con ciclos de vida monoxenos, con una vía de transmisión sencilla y que comúnmente se realiza de forma directa mediante el contacto directo con personas o animales infectados (zoonosis) o sus excrementos, o de forma indirecta, mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal, como frutas y verduras.

Centrándonos en las especies parásitas con mayor relevancia en los pacientes estudiados, *G. intestinalis* fue el parásito más prevalente, con un porcentaje de parasitación del 61,7%, dato muy superior a los determinados en estudios similares realizados en pacientes con TGC y/o sintomatología gastrointestinal crónica. En concreto, en el estudio realizado por Grazioli y colaboradores (2006) en el que participaron 137 pacientes italianos que presentaban patologías gastrointestinales, como SII, intolerancia a lactosa, dispepsia, EC, EII, etc., se encontró un porcentaje de parasitación por este protozoo del 6,5%, valor muy inferior al obtenido en este estudio. En este caso, la baja prevalencia de *G. intestinalis* detectada por Grazioli y colaboradores (2006) pudo deberse a que las técnicas diagnósticas empleadas se basaron en la búsqueda directa de las formas parásitas, el examen histológico y detección de coproantígenos en muestras de biopsias duodenales y heces, dejando de lado los métodos de detección de anticuerpos y los moleculares.

Por otro lado, Fouad y colaboradores (2014) estudiaron la presencia de *G. intestinalis* en 120 pacientes egipcios con sintomatología inespecífica que catalogaron como dispepsia crónica, encontrando porcentajes de parasitación por el protozoo del 15,8%, porcentaje superior al mostrado por Grazioli y colaboradores (2006) pero muy inferior al obtenido en la presente tesis doctoral. En este caso, el aumento de la prevalencia del parásito respecto al estudio anterior pudo deberse al empleo de una PCR convencional con el gen *tpi* como diana, además, de las técnicas convencionales, sin llegar a la sensibilidad obtenida en la presente tesis doctoral gracias a los métodos empleados como la qPCR y el ELISA indirecto.

Por último, en el estudio, mencionado anteriormente, realizado por Trelis y colaboradores (2019) se obtuvo una prevalencia de *G. intestinalis* del 24,5%, porcentaje inferior al obtenido en el presente estudio, pero superior al del resto de trabajos revisados. En este caso, se emplearon métodos diagnósticos de detección directa del parásito, detección de antígenos y de anticuerpos, pero no se realizó PCR convencional o a tiempo real, lo que explicaría la mayor prevalencia obtenida respecto a la de artículos anteriormente mencionados, y la menor prevalencia respecto a la obtenida en la presente tesis doctoral.

El protista *Blastocystis* se halló en menor porcentaje que en el caso de *G. intestinalis*, con una prevalencia del 13,2%, valor similar a los obtenidos por Toro y colaboradores (2018) en su estudio realizado en niños diagnosticados de dolor abdominal crónico en México, y por Trelis y colaboradores (2019), con valores de 13% y 12,6%, respectivamente. En el presente estudio, el resultado de la frecuencia de *Blastocystis* se esperaba que resultara superior a los estudios mencionados, como ocurría con el parásito anterior, debido a que ninguno de éstos empleó métodos de PCR para su diagnóstico, centrándose únicamente en las diferentes técnicas de visualización mediante microscopía óptica.

Discusión

En contraposición, algunos estudios recientes, realizados en pacientes sintomáticos, muestran una prevalencia del protista bastante más elevada que la obtenida en la presente tesis doctoral, como es el caso del estudio realizado por Shirvani y colaboradores (2020) en Irán, que muestra una prevalencia del parásito del 24.5% en pacientes con sintomatología gastrointestinal inespecífica, SII, EII y presencia de urticarias. En este caso, los métodos de diagnóstico fueron similares a los empleados en este estudio, pudiendo indicar una mayor prevalencia de *Blastocystis* en dicho país debido a los diferentes hábitos y estilo de vida de la población, o a unas condiciones higiénico-sanitarias menos cuidadas, tal y como reflejan diversos estudios (Heidari & Rokni, 2003; Tappe et al., 2011; Barkhori et al., 2016; Shaker et al., 2019; Abbaszadeh et al., 2020).

En los Países Bajos, de Boer y colaboradores (2019), observaron un porcentaje de parasitación por *Blastocystis* del 25,8% en pacientes con sintomatología gastrointestinal obtenido mediante qPCR, lo que explica la mayor prevalencia del protista debido a la mayor sensibilidad de la técnica en comparación con la PCR convencional utilizada en el presente estudio. No obstante, la prevalencia del parásito en este estudio fue considerablemente superior en el grupo control conformado por individuos sanos (40%), por lo que sus autores no pudieron demostrar una asociación entre *Blastocystis* y la presencia de síntomas gastrointestinales e, incluso, hipotetizaron que podría formar parte de una microbiota intestinal rica y sana, como sugieren otros trabajos en la literatura científica (Tungtrongchitr et al., 2004; Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Audebert et al., 2016; Nieves-Ramírez et al., 2018; Stensvold & van der Giezen, 2018; Mardani et al., 2019; Gabrielli et al., 2020a; Stensvold et al., 2020). Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, hubiera sido necesario disponer de un grupo control con pacientes sanos y comparar las frecuencias del parásito entre ambos grupos.

Respecto a la prevalencia del resto de especies parásitas halladas en la población de estudio, la baja prevalencia obtenida en cada una de ellas fue similar a la descubierta por otros estudios realizados en población española (Chover et al., 2010; Salvador et al., 2016; Ocaña-Losada et al., 2018; Trelis et al., 2019) indicando que las especies analizadas no son frecuentes en países industrializados encontrándose en mayor medida en pacientes inmigrantes procedentes de países en desarrollo asociadas a una deficiente calidad del agua o a la falta de higiene alimentaria. No obstante, en el estudio realizado en escolares por Chover y colaboradores (2010) en Valencia, se observó una mayor prevalencia del helminto *Enterobius vermicularis* (10,4 vs. 1,4% en el presente estudio), demostrando la mayor frecuencia de este parásito en estudios con predominio de población infantil.

La prevalencia de parasitación general en función del sexo no presentó diferencias significativas, con porcentajes de parasitación ligeramente superiores en los pacientes masculinos (68,4%) que en los femeninos (66,2%), aun siendo mucho mayor la participación de individuos femeninos como ocurre en otros estudios con pacientes con TGC y/o sintomatología (Bujanda et al., 2002; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Trelis et al., 2019).

En el caso de la parasitación por *G. intestinalis*, el protozoo más prevalente, se dio una mayor distribución de casos del sexo femenino (63% vs. 58,2%) pero sin diferencias significativas entre sexos, como se reporta en otros estudios como el de Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017). Al contrario, en el caso de *Blastocystis* la parasitación fue ligeramente superior en los pacientes del sexo masculino (16.5% vs. 12%), como se ha reportado en estudios previos (Salvador et al., 2016; Ocaña-Losada et al., 2018). Respecto al resto de especies parásitas, se halló una asociación significativa con el sexo, indicando una mayor presencia de estas especies en pacientes masculinos (7,6% frente al 2,3% del sexo femenino), pudiendo ser debido

Discusión

a los diferentes hábitos higiénicos entre ambos grupos, tal y como reflejan diversos estudios (Zuk & McKean, 1996; Krasnov & Matthee, 2010; McClelland & Smith, 2011).

La prevalencia de parasitación no presentó diferencias significativas entre los grupos de edad establecidos, ni en cuanto a la frecuencia de la infección ni en las especies parásitas. Los pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 30 años presentaron una mayor parasitación general y una mayor distribución de casos de giardiosis, con resultados similares al estudio realizado por Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017). No obstante, en el estudio realizado por de Boer y colaboradores (2019), la mayor proporción de casos parasitados por *G. intestinalis* se dio en el grupo de edad entre los 15 y 20 años. En el caso de *Blastocystis*, cabe destacar que se dio una mayor distribución de casos en aquellos pacientes con edades superiores a los 50 años, aunque no fue significativa, apoyando la hipótesis de que el protista se asocia con la edad y su presencia es más frecuente en la población adulta (Engsbro et al., 2014; Andersen & Stensvold, 2016; de Boer et al., 2019; Delshad et al., 2020).

En el presente estudio destaca de forma significativa la infección por una sola especie o monoparasitismo (84,8%), producida íntegramente por los protistas *G. intestinalis* y *Blastocystis*, quedando el multiparasitismo, o la infección por 2 o más especies, relegado a valores inferiores (15,2%), donde primó la coinfección por los dos protistas mencionados en un 9,13% de los casos parasitados. Los resultados hallados concuerdan con los datos obtenidos en estudios realizados en población española con TGC y/o sintomatología gastrointestinal, como es el caso del estudio realizado por Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017), donde obtuvieron datos de monoparasitismo por *G. intestinalis* del 80,2%, y de multiparasitismo del 8,5%, con un predominio de coinfección entre *Giardia* y *Blastocystis* o *Cryptosporidium* spp. Lo

mismo ocurre en el caso del estudio realizado por Trelis y colaboradores (2019), con tasas de multiparasitismo del 6,3% en el que se dan coinfecciones entre las especies *G. intestinalis*, *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium parvum*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, y *Iodamoeba buetschlii*, en forma de infección doble e, incluso, triple, como ocurre en el presente estudio.

Sin embargo, en estudios realizados en pacientes sintomáticos procedentes de países endémicos se dan mayores tasas de multiparasitismo, ampliando también el espectro de especies parásitas. Un ejemplo es el estudio realizado por Ocaña-Losada y colaboradores (2018) donde la presencia de infecciones múltiples asciende al 57% y las especies implicadas incluyen protozoos (Complejo *Entamoeba*, *Endolimax nana* y *G. intestinalis*) y helmintos (*S. stercoralis*, *Ancylostoma* spp. y *Schistosoma* spp.). Otro estudio en el que se dan mayores tasas de multiparasitismo es el realizado por Hamdy y colaboradores (2020), donde se dio un porcentaje de casos de multiparasitados del 34,4%, primando la coinfección entre *G. intestinalis* y *Blastocystis* (20%) con un valor superior al obtenido en la presente tesis doctoral.

2. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Como se ha mencionado anteriormente, es posible que la presencia de *G. intestinalis* pase desapercibida en pacientes con infecciones crónicas al realizar el diagnóstico mediante las técnicas convencionales, debido a la baja sensibilidad de la técnica, a la emisión intermitente de quistes y a la baja carga parasitaria en heces. Por ello, para evitar los falsos negativos se emplearon, además, técnicas indirectas, dirigidas a la detección de anticuerpos frente al parásito en el hospedador, y las más sensibles disponibles para muestras fecales.

En el presente estudio, se obtuvo una prevalencia de *G. intestinalis* del 4,4% mediante coprología convencional, en la que se realizó el análisis de tres muestras de heces concentradas por microscopía óptica para la búsqueda de quistes o trofozoítos del parásito. Este resultado concuerda con diferentes estudios realizados en pacientes con TGC o sintomatología intestinal llevados a cabo en países europeos, como es el caso del estudio realizado por Trelis y colaboradores (2019), en pacientes con intolerancia/malabsorción a lactosa y/o fructosa, que obtuvo una prevalencia de parasitación por *G. intestinalis* del 4,8% mediante microscopía óptica. En el caso del estudio realizado por Grazioli y colaboradores (2006) en pacientes con TGC como SII, IL, EC, dispepsia, etc., la prevalencia fue ligeramente superior debido al análisis de tres tipos de muestras biológicas (heces y aspirado y biopsias duodenales), obteniendo porcentajes del 6,4%. Sin embargo, suelen encontrarse prevalencias superiores mediante esta técnica en estudios realizados en países tropicales y subtropicales, como es el caso de los estudios realizados por Forsell y colaboradores (2016) en pacientes con diarrea crónica en Tanzania, donde obtuvieron una

prevalencia del 13,8%, mientras que Fouad y colaboradores (2014) en pacientes egipcios con sintomatología gastrointestinal los valores fueron del 10%, y un 11% para pacientes con dispepsia funcional de Arabia Saudí (Abulhasan et al., 2013).

Los resultados obtenidos mediante el empleo de la técnica de enzoinmunoensayo (ELISA) indirecto para la detección de anticuerpos IgAs específicos anti-*Giardia* en muestras de saliva, mostraron una prevalencia de parasitados por el protozoo del 45,8%, valor muy superior al 17,7% obtenido en el estudio de Trelis y colaboradores (2019) donde se empleó la misma técnica. Estos resultados se encuentran en consonancia con estudios realizados previamente donde se confirma que la detección del anticuerpo IgAs en saliva es un método válido, y poco invasivo, para el diagnóstico de la infección activa por *G. intestinalis* (con una sensibilidad del 76% y una especificidad del 95%), siendo de especial utilidad en aquellos pacientes con exámenes coprológicos negativos y sintomatología compatible persistente (intestinal o extraintestinal) (Rodríguez et al., 2004; El-Gebaly et al., 2012; Trelis et al., 2019). Sin embargo, es posible que un paciente que presente una inmunodeficiencia selectiva de IgA (patología que puede darse en algunos TGC como, por ejemplo, la Enfermedad Celíaca) de lugar a un falso negativo en técnicas indirectas de detección de anticuerpos, por lo que es importante determinar la IgA total en sangre antes de basar el diagnóstico en este único método (Allué, 2015).

En la actualidad, el empleo de los métodos diagnósticos moleculares (PCR) está ganando relevancia debido a su elevada sensibilidad, rapidez y facilidad de manejo, tanto en investigación como en la clínica diaria (Dacal et al., 2020). En el presente estudio, se empleó una qPCR específica del gen *SSU* rRNA de *G. intestinalis* para el diagnóstico del protozoo, obteniendo una prevalencia del 46,8%, valor similar al obtenido mediante el ELISA indirecto y muy superior al obtenido mediante microscopía óptica (4,4%). Estos resultados se ven apoyados por multitud de

Discusión

estudios, varios ejemplos son los mencionados anteriormente, como el realizado por Forsell y colaboradores (2016) donde se obtuvo un aumento en la prevalencia de *G. intestinalis* mediante qPCR hasta alcanzar el 53,4%, o el de Fouad y colaboradores (2016) que hallaron una prevalencia del parásito del 15,8% mediante PCR convencional.

Por lo tanto, con los resultados obtenidos, se puede afirmar que el diagnóstico de *G. intestinalis*, en general y en pacientes con TGC y/o sintomatología persistente, no debería realizarse solamente mediante microscopía óptica, debido a su baja sensibilidad, sino que debería realizarse mediante múltiples técnicas, considerándose la presencia del parásito cuando se obtiene un resultado positivo en una o varias de las técnicas directas en heces (microscopía y PCR) y en la técnica indirecta (ELISA).

En cuanto al diagnóstico de *Blastocystis* sp., el método “gold standard”, al igual que en el caso de *G. intestinalis*, es el etiológico mediante microscopía óptica. Sin embargo, debido a la dificultad de detección de las múltiples formas del protista, y a la incapacidad de diferenciar morfológicamente entre los diferentes subtipos, en las últimas décadas se encuentra al alza el empleo de los métodos de biología molecular.

En el presente estudio, la prevalencia de *Blastocystis* mediante el análisis microscópico de 3 muestras de heces concentradas fue del 7,8%. Resultado similar al obtenido por Gabrielli y colaboradores (2020b) en pacientes italianos con ciertos TGC, como SII y EII, y sintomatología intestinal, en el que obtuvieron una prevalencia del 7,6% mediante la misma técnica. Otro estudio realizado por Delshad y colaboradores (2020) en pacientes iraníes con sintomatología intestinal, aportó una prevalencia similar (7,9%). Sin embargo, otros estudios presentan valores superiores

a los obtenidos, como es el caso del estudio citado anteriormente realizado por Trelis y colaboradores (2019) con un porcentaje del 12,6% en pacientes con malabsorción a carbohidratos y/o sintomatología intestinal. También es el caso del estudio realizado por Forsell y colaboradores (2016), que obtuvo una prevalencia del 20,1% en pacientes con diarrea crónica en Tanzania, país endémico de parasitosis, lo que explica el elevado porcentaje.

En cuanto al método molecular empleado en el caso de *Blastocystis* sp., una PCR convencional con el gen *SSU* rRNA como diana, la prevalencia obtenida fue del 9,8%, valor similar al obtenido mediante microscopía, y más bajo de lo esperado. Estos resultados sugieren que la visualización del protista mediante microscopía óptica de tres muestras de heces concentradas puede resultar en un diagnóstico similar al obtenido mediante PCR convencional, debido a la emisión regular de *Blastocystis* en heces. En contraposición, en el estudio realizado por Not y colaboradores (2020) no hallaron diferencias en la sensibilidad del análisis microscópico al aumentar el número de muestras analizadas. Aun así, algunos estudios muestran la necesidad de analizar más de una muestra para asegurar una mayor sensibilidad de la técnica y el diagnóstico adecuado del protista (Roberts et al., 2011), como se ha corroborado en la presente tesis doctoral.

Comparando el resultado obtenido mediante la PCR convencional con la literatura científica en pacientes con TGC o sintomatología, encontramos prevalencias de *Blastocystis* muy superiores, como es el caso del valor obtenido Roberts y colaboradores (2011) del 18% mediante PCR convencional en pacientes australianos, en la que utilizaron diferentes cebadores específicos para amplificar el mismo marcador genético. Asimismo, aquellos estudios que emplearon una qPCR para el diagnóstico del protista obtuvieron frecuencias de parasitación más elevadas que en este estudio, como es el caso del estudio realizado por de Boer y

Discusión

colaboradores (2019), ya mencionado anteriormente, con la participación de pacientes de los países bajos con gastroenteritis, con un 25,8%; y el estudio de El Safadi y colaboradores (2016) realizado en pacientes franceses con SII, EII y sintomatología intestinal, con un 18,1%. En el caso de países endémicos del protista, las prevalencias que se encuentran son mucho más elevadas, como en el caso del estudio ya citado de Forsell y colaboradores (2016), donde se encontró una frecuencia de parasitación del 60,9%; o el estudio realizado por El Safadi y colaboradores (2014) en niños senegaleses, con o sin sintomatología intestinal, donde se alcanzaron frecuencias de parasitación de 70% mediante PCR convencional e, incluso, del 100% mediante qPCR.

La baja prevalencia del protista detectada en el presente estudio en pacientes con TGC y sintomatología gastrointestinal, podría sugerir que *Blastocystis* se encuentra en menor medida en pacientes con dichas características y, con ello, reforzar la hipótesis de que forma parte de la microbiota intestinal en condiciones normales. No obstante, para declarar certera dicha hipótesis sería necesario realizar un estudio que emplease las técnicas diagnósticas más sensibles y que incorporase un grupo control sano que presentara una mayor prevalencia del parásito, como muestran múltiples estudios (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Audebert et al., 2016; Nieves-Ramírez et al., 2018; Mardani et al., 2019; Gabrielli et al., 2020a).

Por lo tanto, al igual que ocurre en el caso de *G. intestinalis*, el empleo de la técnica considerada de referencia como único método diagnóstico de *Blastocystis* puede dar lugar a falsos negativos, por lo que es recomendable utilizar, además, los métodos de diagnóstico molecular más sensibles como la qPCR para evitar el infradiagnóstico de la blastocistosis.

3. ANÁLISIS MOLECULAR

En el presente estudio, se evaluó la frecuencia y diversidad genética de los aislados de *G. intestinalis* de los pacientes con TGC y/o sintomatología gastrointestinal. De las 138 muestras de DNA positivas mediante qPCR solamente el 38% fueron secuenciadas con éxito. Este bajo rendimiento en la secuenciación puede ser debido a una baja carga de DNA parasitario, a la mala calidad de las secuencias por una inadecuada conservación durante su recolección y transporte, y/o a la presencia de inhibidores en las muestras fecales, que impidan una correcta amplificación durante la PCR convencional. Estudios similares muestran porcentajes de éxito en la secuenciación que varían entre el 20 y 77% (de Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Wang et al., 2019).

Los resultados del genotipado de *G. intestinalis* dieron a conocer la presencia de los dos genotipos más frecuentes en el ser humano, el A y el B. El genotipo A fue el más frecuente (96%) en comparación con el genotipo B, que se descubrió solamente en dos de las muestras analizadas (4%). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017) en pacientes españoles con sintomatología gastrointestinal, entre otros estudios realizados en otros países (Fouad et al., 2014). Sin embargo, múltiples investigaciones muestran datos moleculares donde la frecuencia del genotipo B es mucho mayor (70-83%) que la del A (15-30%), independientemente del tipo de población estudiada, en múltiples regiones de España (de Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Muadica et al., 2020) y a lo largo del mundo (Feng & Xiau, 2011; Ryan & Cacciò, 2013; de Lucio et al., 2016; Messa et al., 2021; Muadica et al., 2021).

En cuanto al subgenotipado del protozoo, los subgenotipos más frecuentes fueron el All (46,2%), seguido del subgenotipo ambiguo Al/All (40,4%) y, en menor

Discusión

ocurrencia, se detectaron los subgenotipos AI (9,6%), BIII (1,9%) y BIV (1,9%). No se encontraron infecciones mixtas A+B. Este resultado se ve avalado por el obtenido por Azcona-Gutiérrez y colaboradores (2017) con una mayor frecuencia del subgenotipo AII (44%). Por el contrario, los resultados moleculares de múltiples estudios muestran el subgenotipo BIV como el más frecuente, tanto en pacientes sintomáticos como en asintomáticos (Goñi et al., 2010; Feng & Xiau, 2011; Ryan & Cacciò, 2013; de Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Gozalbo et al., 2020; Muadica et al., 2020; Messa et al., 2021; Muadica et al., 2021). La variación de los subgenotipos más frecuentes en las diferentes zonas geográficas podría ser multifactorial, en la que se ven implicadas diferentes vías de transmisión, la prevalencia general del parásito, la población humana en riesgo, los hábitos de vida y factores geo-climáticos (Azcona-Gutiérrez et al., 2017).

Respecto al subgenotipo AI/AII, todas las secuencias analizadas mediante el gen *gdh* fueron designadas al subgenotipo AI y mediante el gen *bg* al subgenotipo AII, pudiendo tratarse de una infección mixta por ambos subgenotipos del parásito (AI+AII) o a posibles eventos de recombinación intra-subgenotipo por infecciones mixtas (de Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017), sin embargo, serían necesarios análisis más específicos de los que no se disponían en el presente estudio para poder conocer con detalle la causa.

Como ocurre en otras investigaciones, en el presente estudio se observó una mayor diversidad genética en los aislados de *G. intestinalis* del genotipo B que en los del genotipo A. En el caso del genotipo A, las secuencias de nucleótidos analizadas presentaron una alta tasa de conservación con ninguno, 1 o 2 SNPs para ambos marcadores moleculares (*gdh* y *bg*), encontrando solamente un aislado del subgenotipo AI que presentó un doble pico (indicativo de sitios heterocigotos). Sin embargo, en los 2 aislados del genotipo B, ambos hallados mediante el análisis del

gen *gdh*, se identificaron entre 5 y 6 SNPs concretos, diferentes entre ambos subgenotipos y sin picos dobles. Estas diferencias entre ambos genotipos también han sido observadas en estudios previos (Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Gabín-García et al., 2017; Seguí et al., 2018; Wang et al., 2019; Gozalbo et al., 2020; Messa et al., 2021; Muadica et al., 2021), como el realizado por de Lucio y colaboradores (2015) donde la elevada tasa de mutaciones del genotipo B dio lugar a modificaciones a nivel proteico en los subgenotipos BIII y BIV y la beta-giardina. Debido a estos resultados, múltiples autores han llegado a proponer una diferenciación de los genotipos A y B como especies independientes del parásito (Lasek-Nesselquist et al., 2009; Jerlström-Hultqvist et al., 2010; Adam et al., 2013; de Lucio et al., 2015). La elevada diversidad genética descrita en el genotipo B de *G. intestinalis*, al igual que la elevada tasa de genotipos AI/AII discordantes, y la presencia de dobles picos, podría ser explicada mediante la hipótesis de una posible reproducción sexual del parásito en la que se dé el fenómeno de la recombinación o intercambio de material genético entre e intra subgenotipos de origen humano, entre otros mecanismos (Cooper et al., 2007; Lasek-Nesselquist et al., 2009; Cacciò & Sprong, 2010; Ryan & Cacciò, 2013; de Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Ankarklev et al., 2018; Messa et al., 2021).

La caracterización molecular de *G. intestinalis* en el presente estudio, tanto a nivel de genotipo como de subgenotipo, sugiere que el origen de la infección es antroponótica, con vías de transmisión persona-persona, de forma directa o indirecta. Esta hipótesis se debe a la elevada tasa de los genotipos/subgenotipos presentes de forma predominante en humanos, como ocurre de forma similar en otros artículos publicados en España u otros países, y a la ausencia de genotipos específicos de animales (C-F) (de Lucio et al., 2015; Oliveira-Arbex et al., 2016; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Sánchez-Thevenet et al., 2019; Wang et al., 2019;

Discusión

Muadica et al., 2021), cuya infección por algunos de los genotipos ha podido observarse en el ser humano (de Lucio et al., 2017; Cacciò et al., 2018). No obstante, no se puede descartar una transmisión zoonótica en España a través de animales de compañía, como los perros, en los que se han detectado tasas elevadas de los subgenotipos más frecuentes en el humano (AI, AII, BIII y BIV) (Dado et al., 2012; Gil et al., 2017), aunque varios estudios recientes revelan una baja influencia de los animales domésticos y ganado vacuno como reservorios capaces de producir una transmisión zoonótica del protozoo al ser humano (Cardona et al., 2011; de Lucio et al., 2017; Sánchez-Thevenet et al., 2019). Otros estudios muestran que los subgenotipos de ambos genotipos parecen diferir en la preferencia por los hospedadores, siendo más común encontrar en humanos infecciones producidas por los subgenotipos AII y BIV (antroponóticos), mientras que en animales son más frecuentes el AI y el BIII (zoonóticos) (Feng & Xiau, 2011). La realización de estudios a largo plazo que evalúen los genotipos y subgenotipos mediante secuenciación multilocus, y/o nuevas técnicas de biología molecular y cultivo de protozoos de muestras pertenecientes a humanos y animales de compañía del mismo entorno son necesarios para demostrar la transmisión zoonótica de *G. intestinalis* (Ryan & Cacciò, 2013; de Lucio et al., 2017; Cacciò et al., 2018).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes genotipos/subgenotipos en cuanto a edad y sexo en la población de estudio. En el caso de la edad, no se aprecian diferencias entre los diferentes grupos de edad y la parasitación por un genotipo o subgenotipo específico, no obstante, estudios como el de Wang y colaboradores (2019) muestran una mayor distribución de casos parasitados por el genotipo B en niños menores de 12 años (83 vs. 17% del genotipo A), mientras que la distribución de ambos genotipos fue similar en pacientes adultos (52,4 vs. 47,6%, respectivamente). En cuanto al sexo, algunos

estudios muestran una distribución de los dos genotipos similar en hombres y en mujeres (Wang et al., 2019), como ocurre en el presente estudio, sin embargo, otros estudios muestran una mayor frecuencia del genotipo B en mujeres que en hombres, asociando esta relación al mayor papel de la mujer en el cuidado de los niños (Feng & Xiau, 2011).

Por otra parte, en el presente estudio, la evaluación de la frecuencia y la diversidad de *Blastocystis* se pudo realizar de los 23 pacientes (79%) con TGC y/o sintomatología gastrointestinal que fueron secuenciados con éxito tras el diagnóstico mediante PCR convencional (n=29). Los resultados de secuenciación revelaron la presencia de 5 de los subtipos (ST) descritos en humanos (ST1-ST9 y ST12). En Europa, los subtipos más frecuentes son los ST1–ST4 (Alfellani et al., 2013), lo que concuerda con los subtipos hallados en el presente estudio, con una mayor distribución de casos del ST2 (30,4%), seguido de los subtipos ST3 y ST4 (21,7%), y ST1 (17,4%), con la excepción de la presencia del ST6 (8,7%), subtipo que se encuentra de forma esporádica en el ser humano, presentándose con mayor frecuencia en aves y murciélagos (Cian et al., 2017; Hublin et al., 2020). No se detectaron infecciones mixtas entre diferentes subtipos, ni subtipos específicos de animales (ST10-ST31).

Comparando los resultados obtenidos con otros estudios similares, realizados en pacientes con TGC o sintomatología, vemos que son diversos y que difieren en cuanto a los subtipos más frecuentes. En el único artículo realizado en España (Domínguez-Márquez et al., 2009) en pacientes con sintomatología intestinal se observa un predominio del ST4 (94,1%) en pacientes con diarrea aguda, y una muy baja prevalencia del ST2 (3,9%) y del ST1 (2%), no hallando el resto de los subtipos identificados el presente estudio. Resultados similares se han observado en pacientes con SII, EII y diarrea crónica en Italia (Mattiucci et al., 2016) y en pacientes

Discusión

con diarrea aguda en Dinamarca (Stensvold et al., 2011), apoyando la hipótesis del potencial papel patógeno del ST4 y su relevancia clínica. Por lo contrario, existen estudios que no demuestran una asociación entre el ST4 y patología intestinal (Meloni et al., 2011; Roberts et al., 2013; Muadica et al., 2021), e, incluso, lo consideran como un marcador de una microbiota sana (Tito et al., 2019). Por otra parte, existen estudios realizados en otros países como el de Souppart y colaboradores (2009), realizado en Francia, que muestran aislados del ST2 solamente en pacientes sintomáticos, mientras que el resto de los subtipos encontrados (ST1, ST3 y ST4) fueron hallados tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos. Lo mismo ocurre con el estudio realizado por Roberts y colaboradores (2013) en el continente australiano.

El ST4 se considera un subtipo con una distribución geográfica restringida, predominantemente europea, debido probablemente a una reciente incorporación a la población humana (Stensvold et al., 2012). Por lo tanto, en otros países no europeos se puede encontrar este subtipo de forma esporádica, hallándose una mayor prevalencia de otros subtipos en la población general y pacientes con trastornos gastrointestinales, como es el caso del estudio realizado por Shirvani y colaboradores (2019) en Irán, donde los subtipos ST2 y ST3 prevalecieron en pacientes con SII/EII, y el ST2 en pacientes con urticaria crónica, no hallándose la presencia del ST4. Resultados similares se encontraron en pacientes con sintomatología intestinal en el estudio realizado por Delshad y colaboradores (2020) en Irán, donde se encontraron los subtipos ST1, ST2 y ST3, siendo el ST1 el más prevalente en los pacientes sintomáticos, como ocurre en otros estudios realizados en población de diferentes países (Fouad et al., 2011; El Safadi et al., 2013; Kim et al., 2020).

En cambio, estudios realizados en España en individuos asintomáticos muestran una elevada prevalencia del ST2, como es el caso del estudio realizado por Muadica y colaboradores (2020) mencionado anteriormente, donde se observaron prevalencias similares al presente estudio de los subtipos ST2 (36%), ST3 (22%) y ST4 (19%), con una prevalencia ligeramente superior del ST1 (23%). Otro estudio realizado por Paulos y colaboradores (2018) en población general de Álava, obtuvo una prevalencia muy superior del ST2 en comparación con el presente estudio (62 vs. 30,4%), con porcentajes inferiores para el resto de los subtipos de *Blastocystis*. Con todos estos datos, se podría sugerir que el ST2 no estaría relacionado con la sintomatología presente en la población de estudio, debido a su elevada prevalencia en individuos sanos y asintomáticos.

Conociendo las discrepancias existentes entre los resultados de los diferentes estudios y de la presente tesis doctoral, se podría suponer que la infección por un subtipo concreto del parásito por sí misma no estaría asociada a la enfermedad en el ser humano, interviniendo múltiples factores relacionados con el parásito, como la especie hospedadora de procedencia, y con el hospedador, como puede ser el estado inmunológico o la composición de la microbiota intestinal, entre otros (Deng et al., 2021). No obstante, algunos estudios han dilucidado el papel patógeno de ciertos aislados del subtipo zoonótico ST7, siendo capaz de generar cambios en la microbiota comensal y generar disbiosis intestinal con su patología asociada (Yason et al., 2019). Por lo tanto, para aclarar el papel patógeno de los diferentes ST de *Blastocystis* sería necesario realizar estudios epidemiológicos de larga duración, con un tamaño muestral grande y grupos bien diferenciados de pacientes sintomáticos e individuos sanos, que incluyan el estudio de diversos factores como la composición de la microbiota intestinal y la reacción inmunitaria del hospedador.

Discusión

La diversidad genética de *Blastocystis* varía tanto entre como intra-subtipos, pudiendo encontrar diferencias importantes dentro de un mismo subtipo del parásito (Stensvold et al., 2012). En el presente estudio, tras el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *SSU* rRNA, se observó una mayor diversidad genética en los aislados de *Blastocystis* correspondientes al ST2, en el que se evidenció la presencia de 3 alelos diferentes: 9, 12 y 11+12, encontrando múltiples sitios polimórficos (dobles picos) en el alelo 12, revelando una variación intra-subtipo elevada, y en el alelo mixto 11+12, indicativo de la infección mixta entre alelos. Lo mismo ocurre en el estudio realizado por Muadica y colaboradores (2020) en una cohorte de niños asintomáticos, donde el ST2 presentó una mayor diversidad genética en comparación con la hallada en la presente tesis doctoral, con la presencia de 6 alelos diferentes y 3 infecciones mixtas entre alelos. Además, en la investigación realizada por Paulos y colaboradores (2018) en población general de Álava, también se halló una elevada variabilidad intra-subtipo en el alelo 12 del ST2, además de la infección mixta 11+12. Estos resultados apoyan la evidencia de la presencia de infecciones mixtas que involucran combinaciones inter e intra-alélicas de *Blastocystis* (Scanlan et al., 2015). Sin embargo, la similitud de los resultados entre las diferentes poblaciones estudiadas (sintomáticos vs. asintomáticos) no aportan evidencia de la posible virulencia de los diferentes ST según la variabilidad intra-subtipo, debido a que son mutaciones muy discretas que no representarían cambios a nivel fenotípico o de factores de virulencia del parásito (González-Arenas et al., 2018).

El siguiente subtipo con mayor diversidad genética fue el ST6, el cual ha sido descrito por primera vez en Valencia gracias al presente estudio, aislado de dos pacientes del sexo femenino sin contacto habitual con aves o animales alados, a pesar de su descrito carácter zoonótico (Alfellani et al., 2013; Cian et al., 2017; Gabrielli et al.,

2020b; Hublin et al., 2020). De los dos aislados, uno presentó el alelo 123, y el otro el alelo mixto 122+123, mostrando este último un SNP con la presencia de un doble pico que indicaría la infección mixta por ambos alelos. En el estudio realizado por Seguí y colaboradores (2018) en población brasileña, se encontró un aislado del ST6 de *Blastocystis* con la presencia del alelo 134.

En el resto de los subtipos detectados en el estudio, se obtuvieron secuencias bien conservadas sin la presencia de SNPs, ni sitios polimórficos (dobles picos), hallando solamente un alelo en cada uno de ellos. En el caso de los aislados del ST4, se reveló en todos ellos el alelo 42, considerado el más común en el ser humano (Stensvold et al., 2012; de la Cruz & Stensvold, 2017), y concordante con los resultados obtenidos en otros estudios realizados en España (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020), y otros países (Seguí et al., 2018). En todos los aislados del ST3, se halló la presencia del alelo 34, al igual que en el estudio realizado por Paulos y colaboradores (2018); en contraposición, Muadica y colaboradores (2020) encontraron una elevada variabilidad genética en el ST3 con la presencia de tres alelos diferentes, incluyendo el alelo 34, y una infección mixta entre alelos, como se ha observado en estudios realizados en otros países (Delshad et al., 2020). Además, otros autores han demostrado una elevada tasa de diversidad genética intra-subtipo en el ST3, lo que podría explicar las diferencias en la especificidad del hospedador y la distribución geográfica (Stensvold et al., 2012). Por último, en todos los aislados del ST1 hallados se evidenció la presencia del alelo 4, al igual que en los estudios realizados por Paulos y colaboradores (2018) y Muadica y colaboradores (2020), sin embargo, en esta última investigación también se halló la presencia del alelo 77.

La presencia de los subtipos más frecuentes encontrados en el humano, y la ausencia de la mayoría de los subtipos específicos de animales, podría indicar una transmisión del protista de origen predominantemente antroponótico, excepto en aquellos

Discusión

casos de infección por el subtipo zoonótico ST6, cuya transmisión se da en la mayoría de los casos por contacto frecuente con aves o por el consumo de alimentos o aguas contaminadas con las heces de estos animales (Alfellani et al., 2013; Cian et al., 2017; Gabrielli et al., 2020b; Hublin et al., 2020). Sin embargo, no se puede descartar la posible transmisión zoonótica debido a la elevada prevalencia de los ST 1-4 en otros animales, pudiendo ser considerados como reservorios de *Blastocystis* (Paulos et al., 2018; Skotarczak, 2018; Maloney et al., 2019; Calero-Bernal et al., 2020; Hublin et al., 2020), aunque algunos autores sugieren una baja transmisión animal-humano (Stensvold et al., 2020).

Para concluir, el análisis molecular de los diferentes ST, tanto inter como intra-subtipo, podría ayudar a la clarificación del potencial zoonótico del protista, indicando los posibles reservorios animales y ambientales, y las diferentes vías de transmisión en áreas concretas (Stensvold et al., 2012; Skotarczak, 2018; Hublin et al., 2020), además de aportar información necesaria para ampliar el conocimiento sobre su posible papel patógeno o comensal (Skotarczak, 2018).

En el presente estudio no se encontró una asociación positiva entre la distribución de los diferentes subtipos de *Blastocystis* en cuanto al sexo y la edad de la población, como se ha reportado en otros estudios (Scanlan et al., 2014; Delshad et al., 2020; Muadica et al., 2020). En cuanto al sexo, aunque los resultados no fueron significativos sí se pudo observar una mayor concentración de casos del ST3 y ST1 en los pacientes del sexo masculino, y del ST4, ST2 y ST6 en los del sexo femenino, encontrándose únicamente los subtipos ST4 y ST6 en mujeres. En consonancia con los resultados obtenidos, encontramos el estudio realizado por Forsell y colaboradores (2012) en pacientes suizos, en el que muestra una asociación significativa entre el sexo masculino y la presencia del ST3 (58,3 vs. 33,3% en el sexo femenino), mientras que se observó una mayor cantidad de casos de ST4

relacionada con el sexo femenino, sin confirmarse estadísticamente la asociación (29,6 vs. 13,9% en el sexo masculino); sin embargo, otros estudios no encontraron diferencias en la distribución de los ST entre sexos (Mattiucci et al., 2016; Paulos et al., 2018). En cuanto a la edad, en el presente estudio destaca la presencia del protista en el grupo de edad entre 31-50 años, con mayores prevalencias del subtipo ST3, mientras que los subtipos ST2 y ST4 se encontraron con la misma frecuencia en el citado grupo y en mayores de 50 años, sin confirmarse una asociación positiva entre ambas variables. Corroborando estos resultados encontramos el estudio realizado por Mattiucci y colaboradores (2016) en población italiana, que mostró una predominancia significativa del ST3 en los grupos con edades comprendidas entre los 23-39, 15-22 y 40-59, entre las que se encuentra el rango de edad predominante en el presente estudio; además, presentaron una ligera correlación en los pacientes con edades comprendidas entre los 40-79 años con el ST4, y entre los 60-75 años con el ST2, corroborando la mayor prevalencia de estos dos ST en individuos adultos. En contraposición, el mismo estudio encontró una asociación significativa entre el ST1 y los pacientes con edades comprendidas entre los 23-39 años, mientras que en el presente estudio este subtipo no predominó en ningún grupo de edad (Mattiucci et al., 2016). Para corroborar una posible asociación epidemiológica específica con los diferentes subtipos sería necesario realizar el análisis en un mayor número muestral.

4. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-TGC Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

En las últimas décadas múltiples grupos de investigación han centrado sus estudios en la relación entre las infecciones parasitarias y la presencia de Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC), siendo los más estudiados el Síndrome del Intestino Irritable (SII) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).

En la presente tesis doctoral se observó que los pacientes con una infección parasitaria activa presentaban una mayor prevalencia de TGC que aquellos pacientes no parasitados. Sin embargo, pese a las diferencias entre ambos grupos no se pudo establecer una asociación significativa TGC-parasitación intestinal.

No obstante, múltiples estudios han mostrado que una infección parasitaria por una o varias especies concretas podría ejercer como desencadenante o agravante de ciertos TGC o su sintomatología asociada mediante mecanismos como la disrupción de la barrera intestinal, alteración del sistema inmunitario, alteración de la microbiota intestinal, entre otros, que provocan cambios funcionales y una fisiología intestinal y/o extraintestinal anormal asociada con síntomas persistentes incluso tras la erradicación de la infección (Blitz et al., 2018). Un ejemplo sería el caso del SII, donde diversos estudios muestran que tras una infección parasitaria por especies como *G. intestinalis*, *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis*, *E. histolytica*, etc. podría originarse la enfermedad o generarse sintomatología similar tras eliminar al parásito, lo que se denomina SII post-infeccioso (Stark et al., 2007; Hanevik et al., 2009; Vasquez-Rios et al., 2016; Jadallah et al., 2017; Klem et al., 2017; Allain & Buret, 2020; Shafiei et al., 2020). Otro caso sería el de las intolerancias/malabsorciones a carbohidratos, lactosa y fructosa, entre otros, donde

especies parásitas como *G. intestinalis*, son capaces de generar síndromes de malabsorción secundarios a la infección parasitaria que se resuelven tras el tratamiento farmacológico (Moya-Camarena et al., 2002; Trelis et al., 2019; Fernández et al., 2020). Continuando con la EII, Yamamoto-Furusho y Torijano-Carrera (2010) mostraron una prevalencia de parasitación intestinal por protozoos significativamente superior en aquellos pacientes con colitis ulcerosa (CU) persistente, que en aquellos que presentaban CU activa, inactiva o intermitente, concluyendo que dichas especies podrían estar contribuyendo a la persistencia de la patología pese a recibir el tratamiento óptimo. Por último, se ha observado una mayor prevalencia de parásitos patógenos en pacientes que presentan EC con síndromes de malabsorción, que en controles sanos (Behera et al., 2008).

Respecto a las otras patologías, gastrointestinales y extraintestinales, que no se incluyeron en el grupo de los TGC, en ningún caso se relacionaron de forma significativa con el estado parasitario de los pacientes. En el caso del sobrecrecimiento bacteriano (SIBO), se incluyó en el estudio debido a la sintomatología similar, pudiendo confundirse con un TGC o con una infección parasitaria, ya que se define como un síndrome malabsortivo caracterizado por esteatorrea y anemia megaloblástica con la presencia de gran variedad de síntomas dependiendo de la gravedad, como dolor y distensión abdominal, plenitud posprandial, diarrea acuosa, flatulencias, meteorismo, déficit de macro y micronutrientes, pérdida de peso, malnutrición, etc. (Vázquez & Gallego, 2020). Algunos estudios muestran como ciertas infecciones parasitarias puede modificar la microbiota y causar daños en la funcionalidad y estructura intestinal (Halliez & Buret, 2013; Nourrisson et al., 2014; Yason et al., 2019; Fekete et al., 2021), lo que podría dar lugar a un sobrecrecimiento bacteriano que influyera en el malestar del

Discusión

paciente, sin embargo, a fecha de hoy, no se han encontrado estudios que investiguen esta posible asociación.

Respecto al resto de patologías que presentaban los pacientes de estudio (infección por *Helicobacter pylori*, alergias, otras patologías gastrointestinales y autoinmunes), su presencia podría aportar información útil para el diagnóstico, tanto de una infección parasitaria como de algunos de los TGC estudiados en la presente tesis doctoral. La infección por *H. pylori* se asocia directamente con la gastritis crónica (Crafa et al., 2018; Fang et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020), asimismo se ha descrito que la presencia del bacilo, debido a la aclorhidria que provoca, podría aumentar el riesgo de una parasitación intestinal producida por protozoos como *G. intestinalis* o *Cryptosporidium* spp., y la coinfección *pylori*-parásitos puede contribuir al desarrollo y la exacerbación de complicaciones gastrointestinales (El-Badry et al., 2017; El-Badry et al., 2018; Taghipour et al., 2020).

El papel patógeno de *G. intestinalis* ha sido demostrado por múltiples estudios científicos, desencadenando o agravando los TGC estudiados o la sintomatología asociada (Blitz et al., 2018), pese a que es un protozoo que puede encontrarse tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos (Halliez & Buret, 2013; Hanevik et al., 2014; Bartelt & Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016; Muadica et al., 2020).

En la presente tesis doctoral se detectó una elevada prevalencia de *G. intestinalis*, con una mayor distribución de casos entre los pacientes con TGC. Sin embargo, no se pudo demostrar que el parásito se asociara de forma significativa con ninguno de los trastornos crónicos estudiados.

Cabe destacar que la presencia de *Giardia* fue mucho mayor en aquellos pacientes que sufrían intolerancia/malabsorción a los carbohidratos, aunque la asociación no resultó significativa. Esto concuerda con la información de que este protozoo es

capaz de originar un síndrome malabsortivo de carbohidratos secundario a la infección (Moya-Camarena et al., 2002; Trelis et al., 2019; Fernández et al., 2020). La fructosa fue el carbohidrato con mayores tasas de intolerancia/malabsorción en los pacientes parasitados por *G. intestinalis*, como ocurre en el estudio realizado por Trelis y colaboradores (2019), en el que se describió por primera vez una relación significativa entre la infección por el parásito y la malabsorción a fructosa, sugiriendo que la inflamación y disrupción del epitelio intestinal producida por el protozoo afecta a la expresión y la actividad de los transportadores específicos del monosacárido dando lugar a una malabsorción secundaria que generará la sintomatología asociada. En el caso de la intolerancia/malabsorción de lactosa (IL), también se presentó una elevada prevalencia del parásito, pero la asociación tampoco resultó significativa, no pudiendo demostrarse el papel de *G. intestinalis* en el origen de una IL secundaria a la infección, como ocurre en estudios previos (Grazioli et al. 2006; Wensaas et al., 2012; Trelis et al., 2019). Sin embargo, otros estudios han observado la presencia de IL en pacientes con giardiosis (Moya-Camarena et al., 2002).

En el presente estudio, se observó un elevado número de casos de coexistencia entre la EC y la parasitación por *G. intestinalis*, sin embargo, no se halló una asociación significativa entre ambas variables. Existe evidencia de que la infección por el protozoo, y la afectación del epitelio intestinal que produce, es capaz de desencadenar la EC en pacientes genéticamente predispuestos (Carroccio et al., 2001; Edling et al., 2012; Tchidjou et al., 2015), aunque otros estudios sugieren que es necesaria una mayor investigación para confirmar dicha afirmación (Hanevik et al., 2018). Ciertos casos clínicos han demostrado que el protozoo es capaz de generar un daño duodenal similar a la EC con atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas, infiltración linfocitaria y sintomatología asociada, entre otras, que remiten

Discusión

tras el tratamiento parasitario (Sorell et al., 2004; Edling et al., 2012; Rahmoune et al., 2017; Saurabh et al., 2017; Corleto et al., 2018), pudiendo ser el caso de los pacientes del presente estudio que no disponían de todas las pruebas diagnósticas, pero sí que presentaban daño en la mucosa intestinal.

En cuanto al SII, no se halló una correlación positiva con la giardiosis, aunque, como ocurría con las patologías anteriores, el número de casos fue mucho mayor en los pacientes parasitados. En contraposición, en el estudio realizado por Jadallah y colaboradores (2017), sí que se encontró una relación significativa entre la presencia del parásito y la patología, pero la relación entre la patología y la giardiosis todavía no está confirmada. En la literatura científica se ha descrito que la infección por *G. intestinalis* puede presentar una sintomatología similar al SII (Vivancos et al., 2018; Salem et al., 2019; Allain & Buret, 2020), por lo que ambas condiciones podrían ser confundidas en el momento del diagnóstico. Por otra parte, diversos estudios han corroborado la asociación entre la infección aguda causada por el parásito y el posterior desarrollo de la patología y síntomas asociados, lo que se conoce como SII post-infeccioso (Hanevik et al., 2009; Wensaas et al., 2011; Hanevik et al., 2014; Klem et al., 2017). Por lo tanto, si consideramos que la giardiosis que presentan los pacientes del presente estudio es crónica, se podría sugerir un desarrollo de la patología como consecuencia de los mecanismos desencadenados por el parásito a largo plazo (hipersensibilidad visceral, pérdida de la función barrera, alteración de la microbiota, etc.) (Halliez & Buret, 2013; Allain & Buret, 2020).

Los pacientes con EI constituyeron un grupo reducido dentro del estudio. Entre ellos, se observó un mayor número de casos con *G. intestinalis* asociados con la Colitis ulcerosa (CU), que con Enfermedad de Crohn (E. Cr). Sin embargo, en ningún caso se halló una relación significativa entre las variables. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Toychiev y colaboradores (2021) donde muestran una

prevalencia del protozoo similar en pacientes con CU y el grupo control; asimismo, Yamamoto-Furusho & Torijano-Carrera (2010) no hallaron al parásito en pacientes con CU, concluyendo ambos estudios que *G. intestinalis* no se relaciona con la enfermedad. Por lo contrario, varios estudios y casos clínicos muestran que las infecciones gastrointestinales causadas por parásitos patógenos, entre los que se encuentra *G. intestinalis*, son capaces de desencadenar la EII (Goodman et al., 1980; Axelrad et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que *G. intestinalis* es capaz de imitar las lesiones intestinales características de la EII, la sintomatología asociada y elevar ciertos parámetros analíticos como la calprotectina fecal (Desai & Craig, 1989; Gunasekaran & Hassall, 1992; Mohammad et al., 2018a; Zhen et al., 2018), por lo que, en pacientes que sufren esta patología, debería incluirse un diagnóstico diferencial que incluya la infección por *G. intestinalis*.

Como ocurre en el resto de TGC, la asociación de casos de gastritis crónica y de parasitados por *G. intestinalis* fue elevada, pero no fue significativa. En condiciones normales, el parásito no es capaz de sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, sin embargo, en condiciones de aclorhidria podría producirse una migración de *G. intestinalis* hacia la mucosa gástrica (Taghipour et al., 2020). En la literatura científica apenas existen referencias que aclaren el papel que pueda ejercer el protozoo en el desarrollo de la enfermedad. Algunos estudios no encuentran relación entre la presencia del parásito y la gastritis (Oberhuber et al., 1997), no obstante, múltiples casos clínicos han revelado la presencia de *G. intestinalis* en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal de estómago (Doglioni et al., 1992; Quincey et al., 1992; Berney et al., 1994; Sanad et al., 1996; Brieva et al., 1998; Misra et al., 2006; Gheorghe et al., 2017). Sin embargo, no es posible conocer si el protozoo juega un papel importante en el desarrollo de la patología o es un mero oportunista capaz de agravar la patogenia de la enfermedad y la

Discusión

sintomatología asociada (Hosni et al., 1987; Sanad et al., 1996; Brieva et al., 1998). La coinfección con *H. pylori* también fue elevada en los pacientes parasitados por *G. intestinalis*, siendo descrita en múltiples ocasiones en pacientes con gastritis y cáncer de estómago, mostrando cambios en la mucosa gástrica mediante infiltración linfocítica (Doglioni et al., 1992; Quincey et al., 1992; Sanad et al., 1996; Misra et al., 2006; Isaeva & Efimova, 2010). Por otra parte, la coinfección entre *G. intestinalis* y *H. pylori* ha sido descrita en múltiples estudios de forma significativa, sugiriendo que la presencia del microorganismo y los cambios en las concentraciones de ácido clorhídrico estomacal que ocasiona, facilitarían la supervivencia del parásito (Grazioli et al., 2006; El-Badry et al., 2017; Taghipour et al., 2020).

El resto de las patologías asociadas incluidas en el estudio tampoco se relacionaron de forma significativa con la presencia de *G. intestinalis*, aun así, cabe destacar la elevada prevalencia de SIBO presente en la población de estudio y, en concreto, en los pacientes parasitados por *G. intestinalis*, aunque la asociación no fue significativa. Lo mismo ocurre en ciertos estudios donde la presencia del protozoo no se relaciona con el SIBO (Bhatnagar et al., 1992). Sin embargo, múltiples estudios han demostrado la capacidad del protozoo de generar disbiosis en humanos (Allain & Buret, 2020; Berry et al., 2020; Fekete et al., 2021), y sobrecrecimiento de las bacterias comensales de duodeno en ratones y humanos, presentando una mayor sintomatología (Tandon et al., 1977; Farthing, 1993; Torres et al., 2000; Moya-Camarena et al., 2002; Chen et al., 2013; Allain & Buret, 2020). Estos resultados sugieren que el protozoo es capaz de desencadenar la condición e inducir una mayor respuesta inflamatoria por el paso de estas bacterias a través de las uniones estrechas del epitelio intestinal, perdurando incluso tras la erradicación del parásito (Torres et al., 2000; Chen et al., 2013).

Por último, y aunque no significativa, mencionar la mayor presencia de alergias en los pacientes parasitados por *G. intestinalis* que, en los no parasitados. En la literatura científica se han descrito la capacidad del protozoo de generar manifestaciones extraintestinales a largo plazo, como alergias cutáneas, producidas, seguramente, por una alteración en la absorción y sensibilización de antígenos que desataría una respuesta inmunitaria exagerada (Halliez & Buret, 2013; Allain & Buret, 2020). Por este motivo, puede ser posible que el aumento de casos de alergia observados en la población parasitada sea dado por la presencia del parásito, tal y como se ha reflejado en diversos estudios (Di Prisco et al., 1993; Mahmoud et al., 2004; Feary et al., 2011; Thébault et al., 2020), e, incluso, la presencia de urticaria y prurito pueden explicarse como una alergia asociada a esta infección, tal y como demostraron Nenoff y colaboradores en su estudio de 2006.

En el caso de la parasitación *Blastocystis*, y como se ha mencionado anteriormente, todavía no se ha revelado el papel del protista en la salud o enfermedad de la población. En las últimas décadas, múltiples estudios hacen referencia al potencial patógeno del parásito y sus subtipos, y a su asociación con ciertas patologías gastrointestinales crónicas (Yakoob et al., 2010b; Nourrisson et al., 2014; Cifre et al., 2018; Yason et al., 2019). Sin embargo, más recientemente están surgiendo investigaciones que opinan lo contrario, considerando al protista un componente de la microbiota intestinal sana (Scanlan et al., 2014; Audebert et al., 2016; Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramírez et al., 2018; Mardani et al., 2019; Reh et al., 2019; Tito et al., 2019; de Boer et al., 2020; Gabrielli et al., 2020a; Stensvold et al., 2020).

En la presente tesis doctoral, encontramos una pobre presencia de *Blastocystis* en asociación con los TGC y el resto de las patologías estudiadas, con una muestra de 39 pacientes en el grupo de parasitados por *Blastocystis* y de 98 pacientes en el grupo de pacientes no parasitados. Aun así, destaca una asociación

Discusión

significativamente positiva entre la presencia del protista y la condición de intolerancia/malabsorción a lactosa (IL), no pudiendo determinar un subtipo concreto como el causante. Esta asociación se ha observado anteriormente en la literatura científica, en pacientes pediátricos con esta patología (Vichido-Luna et al., 2016) donde hacen alusión al proceso inflamatorio de la mucosa intestinal provocada por el protista, lo que disminuye la expresión de la enzima lactasa en el borde del cepillo del intestino delgado como causa de la malabsorción de lactosa y su sintomatología asociada. Sin embargo, otros estudios más recientes no muestran una asociación entre el parásito y la IL, encontrando múltiples causas por las que se puede producir esta patología, entre ellas TGC como la EC (Trelis et al., 2019; Gozalbo et al., 2020). Aun así, sería interesante comprobar si la asociación obtenida se daría en una muestra con mayor número de participantes. Por otra parte, no se encontró una relación positiva entre el protista y la intolerancia/malabsorción a fructosa, esto puede ser debido a que su presencia en colon no llegaría a afectar al proceso de absorción de dicho carbohidrato en intestino delgado proximal, como se ha reflejado en otros estudios similares (Trelis et al., 2019).

A lo largo de las últimas décadas se ha buscado en múltiples ocasiones una relación entre la blastocistosis y el SII, debido a la sintomatología inespecífica similar y a la presencia del parásito tanto en pacientes con la patología como en individuos sanos, arrojando resultados discrepantes en los que diversas investigaciones muestran el rol patógeno de *Blastocystis* en la enfermedad (Giacometti et al., 1999; Yakoob et al., 2010a; Yakoob et al., 2010b; Poirier et al., 2012; Nourrisson et al., 2014; Rostami et al., 2017b; Salem et al., 2019; Shafiei et al., 2020), mientras que otras exponen lo contrario (Tungtrongchitr et al., 2004; Stark et al., 2007; Surangsrirat et al., 2010; Morgan et al., 2012; Engsbro et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Khademvatan et al., 2017; Krogsgaard et al., 2018; Stensvold et al., 2020; Salvador et al., 2021). En el

presente estudio no se reveló una asociación positiva entre *Blastocystis* y este trastorno funcional, encontrando mayor número de casos de pacientes con SII y no parasitados, como ocurre en otros estudios (Stark et al., 2007; Engsbro et al., 2014; Krogsgaard et al., 2015; Salvador et al., 2021). Asimismo, tampoco se evidenció una relación significativa entre un subtipo concreto de *Blastocystis* y la patología, siendo el subtipo ST2 el más prevalente, seguido del ST1, ST4 y ST6, lo que concuerda con el estudio de Engsbro y colaboradores (2014); sin embargo, otros estudios hallaron una asociación significativa entre el ST1 y la enfermedad (Yakoob et al., 2010b; Fouad et al., 2011; Rostemi et al., 2017), mientras que en otras investigaciones el ST3 resultó el más frecuente en estos pacientes (Dogruman-AI et al., 2009; Khademvatan et al., 2017; Shirvani et al., 2020). Por último, Yason y colaboradores (2019) mostraron que ciertos aislados del ST7 son capaces de generar disbiosis y desencadenar SII, no obstante, en el presente estudio no se identificó dicho subtipo.

En cuanto a la EC, se detectó una baja prevalencia del parásito en estos pacientes. Al revisar la literatura científica, apenas se hallaron estudios que valorasen la influencia del protista en la patología. Villa y colaboradores (2012) realizaron un estudio en pacientes con EC y consideraron a *Blastocystis* como un oportunista cuando aparecían más de 5 formas por campo óptico durante el análisis coprológico, en aquellos pacientes sintomáticos con atrofia vellositaria subtotal o total y bajo peso. Al contrario que en el presente estudio, Calderón de la Barca y colaboradores (2020), hallaron una elevada prevalencia del protista en pacientes con EC, sin embargo, no pudieron demostrar que ejerciera un papel determinante en la patología, encontrando en algunos de los pacientes con blastocistosis una microbiota con abundancia de bacterias beneficiosas. Tras conocer los resultados del presente estudio y las conclusiones de los artículos mencionados, no se puede afirmar que *Blastocystis* esté relacionado con el desarrollo o la exacerbación de la

Discusión

EC, pero se podrían sugerir dos opciones: es un oportunista, estableciéndose en el hospedador gracias a las condiciones óptimas generadas por la patología (reducción del sistema inmunitario, atrofia vellositaria, etc.), o forma parte de la microbiota comensal. Por otra parte, en el presente estudio se halló únicamente el ST4 en los pacientes con EC, casi demostrándose una asociación positiva entre ellos, sin embargo, debido a la falta de estudios que aporten información sobre la caracterización molecular del parásito en pacientes con esta patología, se puede sugerir que el ST4 es el subtipo del protista más prevalente en la EC.

Respecto a la EII, a nivel general no se encontró una relación positiva entre la patología y la parasitación por *Blastocystis*, al igual que ocurre en otros artículos revisados de la literatura científica (Yamamoto-Furusho & Torijano-Carrera, 2010). Sin embargo, sí que se halló una asociación significativa entre los pacientes con EII y la presencia del ST1, siendo el único subtipo presente en los pacientes que sufren esta patología, aun así, no se pudo concretar la asociación de dicho ST con la enfermedad de Crohn o la Colitis ulcerosa debido al bajo número de casos. Comparando estos resultados con los descritos en la literatura científica, se observan diferencias en los subtipos hallados en pacientes con la enfermedad, encontrando mayores prevalencias del ST3 en pacientes con EII y CU (Dogruman-Al et al., 2009; Coskun et al., 2016). Por otra parte, un estudio realizado por Yason y colaboradores (2019), *in vitro* y en modelos animales con CU, sugirió que diferentes aislados del ST7 podrían desencadenar la patología en pacientes susceptibles de forma directa y produciendo disbiosis; sin embargo, no se ha demostrado en humanos ni en infecciones por otros subtipos. Otro estudio realizado por Tai y colaboradores (2011) en seis pacientes con CU refractaria e infección por *Blastocystis*, mostraron la remisión de la sintomatología tras el tratamiento antiparasitario, sugiriendo su pronto diagnóstico para la mejora de la calidad de vida

de estos pacientes. Aun así, cabe destacar que en la mayoría de los estudios revisados se reporta una baja colonización por *Blastocystis* en pacientes con EII, estando presente en la mayoría de ellos en fases de remisión más que en las fases activas de la enfermedad, por lo que podría considerarse una infección oportunista y relativamente rara en la EII (Petersen et al., 2013; Andersen & Stensvold, 2016; Audebert et al., 2016; Coskun et al., 2016; Kök et al., 2019; Matijašić et al., 2020; Stensvold et al., 2020).

En relación con la gastritis crónica, se halló una baja relación de la misma con los casos de los pacientes parasitados por *Blastocystis*. Estos resultados se encuentran en concordancia con la literatura científica, ya que entre las infecciones parasitarias que suelen relacionarse con esta condición no se encuentra la blastocistosis, siendo los parásitos responsables más frecuentes *Cryptosporidium* spp., *Strongyloides stercoralis* y *Anisakis simplex*, parásitos de estómago o parte alta intestinal (Fang et al., 2018; Azer & Akhondi, 2020). Un ejemplo de la baja prevalencia de *Blastocystis* en esta patología se puede observar en el estudio realizado por Melo y colaboradores (2019) donde solamente un paciente parasitado por el protista presentó gastritis, lo que podría explicarse por la ubicación colónica de *Blastocystis*. Los subtipos más frecuentes encontrados en estos pacientes fueron el ST2 y ST3, mientras que en el estudio de Melo y colaboradores (2019) el subtipo encontrado fue el ST4. Por lo tanto, con los datos disponibles no es posible identificar si *Blastocystis* juega un papel en la gastritis crónica, siendo necesarios más estudios que aporten más información.

5. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN PARÁSITOS-SINTOMATOLOGÍA

Como se ha mencionado anteriormente, las parasitosis intestinales pueden presentarse en el hospedador de forma sintomática o asintomática (Fletcher et al., 2012; McHardy et al., 2014; Plutzer et al., 2016; Reh et al., 2019). No obstante, en la presente tesis doctoral se estudia la presencia de las parasitosis más prevalentes en pacientes sintomáticos.

Al analizar la sintomatología gastrointestinal en la población de estudio se observó una mayor prevalencia de los síntomas en el grupo de pacientes parasitados en comparación con el de pacientes no parasitados, sin poderse demostrar una relación significativa entre la infección parasitaria y un síntoma específico. Los síntomas más frecuentes fueron los siguientes: dolor abdominal, flatulencias moderadas/severas, distensión abdominal moderada/severa, grasa en heces, dispepsia y diarrea. Dicha sintomatología concuerda con la descrita en los artículos revisados, siendo los síntomas más frecuentemente reportados el dolor abdominal, diarrea y distensión abdominal, entre otros (Bujanda et al., 2002; Fletcher et al., 2012; del Coco et al., 2017; Trelis et al., 2019; Hamdy et al., 2020). Estos resultados demuestran que las infecciones parasitarias producen en el hospedador principalmente una sintomatología inespecífica que puede ser confundida con múltiples patologías y complicar su correcto diagnóstico y tratamiento, lo que puede dar lugar a una cronificación con complicaciones a largo plazo.

Además, también se analizó si la presencia de la sintomatología gastrointestinal se producía de forma intermitente y sincrónica, sintomatología cíclica, hallando una

asociación significativa entre las parasitosis y los pacientes con síntomas de gravedad más acusada en periodos intermitentes.

Por otra parte, se realizó el análisis de la sintomatología extraintestinal presente en la población estudiada, obteniendo unas prevalencias muy superiores en los pacientes parasitados y hallando una asociación significativa entre la parasitación y la presencia de fatiga crónica, pérdida de peso acusada y dolor articular, síntomas descritos previamente en la literatura científica producidos por especies parásitas como *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. (Fletcher et al., 2012; Halliez & Buret, 2013; Hanevik et al., 2014; Hanevik et al., 2017; Roshan et al., 2020).

En el análisis de la sintomatología gastrointestinal asociada a *Giardia intestinalis* se observó una mayor prevalencia de todos los síntomas en el grupo de pacientes parasitados. La sintomatología producida por *G. intestinalis* observada con mayor frecuencia en el presente estudio fue: dolor abdominal, flatulencias, distensión abdominal, grasa en heces, dispepsia y diarrea. Estos síntomas son similares a los reportados por otros estudios, donde los más frecuentes en pacientes sintomáticos fueron la diarrea, el dolor y distensión abdominal, dispepsia, entre otros (Hanevik et al., 2009; Trelis et al., 2019; Wang et al., 2019; Hamdy et al., 2020).

La presencia de sintomatología intermitente o cíclica también fue analizada en función de la parasitación por *G. intestinalis*, resultando una asociación significativa entre las variables. Esta condición, poco tenida en cuenta en la práctica clínica diaria, es característica en pacientes sintomáticos parasitados por el protozoo, siendo reportada en múltiples estudios, además de asociada a ciertos genotipos del parásito (Fouad et al., 2014; Verweij & Stensvold, 2014). Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Homan y Mank (2001) en el que se asoció la presencia de diarrea intermitente o cíclica en aquellos pacientes parasitados por el genotipo A del

Discusión

protozoo, genotipo predominante en el presente estudio, aunque la asociación no pudo ser relacionada con un subgenotipo concreto.

Además, se realizó el análisis de la sintomatología extraintestinal en el que, de nuevo, se obtuvo unas prevalencias de cada síntoma mucho más elevadas en los pacientes parasitados. En este caso se demostró una asociación positiva entre los pacientes parasitados por el protozoo y diversos síntomas, destacando la fatiga crónica, la pérdida de peso acusada, el dolor articular y la presencia de urticarias, todos ellos previamente descritos en la literatura científica, producidos como consecuencia de una infección crónica por *G. intestinalis*. En el caso de la fatiga crónica, se desconoce el mecanismo por el que el parásito la origina, pero se ha supuesto que es consecuencia de una alteración del sistema inmunológico, como muestran los estudios realizados por Hanevik y colaboradores (2014 y 2017) en pacientes que desarrollaron un Síndrome de Fatiga Crónica post-infeccioso tras un brote de *G. intestinalis* en Noruega (2004), además del síndrome malabsortivo que produce, entre otros factores (Halliez & Buret, 2013). La pérdida de peso en la giardiasis crónica se ha reportado en multitud de estudios, producida como consecuencia de la anorexia y el síndrome de malabsorción, tanto de micronutrientes como de macronutrientes, destacando la malabsorción de grasas, mecanismos producidos debido a la activación de la respuesta inmunitaria y la inflamación intestinal (Halliez & Buret, 2013; Trelis et al., 2019; Allain & Buret, 2020). En cuanto al dolor articular, algunos estudios y casos clínicos demuestran que el protozoo es capaz de generar artritis reactiva e inflamatoria post-infecciosa, en las que interviene una alteración del sistema inmunitario del hospedador con reacciones de hipersensibilidad y reactividad cruzada de anticuerpos (Arman, 1991; Gato et al., 1998; LeBlanc & Birdi, 1999; Carlson & Finger, 2004; Halliez and Buret, 2013; Krol, 2013; Painter et al., 2017; Rumsey & Waseem, 2020). Por último, la

presencia de urticarias también ha sido evidenciada, aunque el mecanismo no es del todo conocido, se ha sugerido el papel del protozoo en la disrupción de la barrera intestinal y las uniones estrechas que, junto con la sobreexposición del sistema inmunitario del hospedador a múltiples antígenos lumbales procedentes de la alimentación, de la microbiota e, incluso, del propio parásito, actuarían como desencadenante de la patología (Di Prisco et al., 1998; De Breucker et al., 2010; Halliez & Bureau, 2013; Humbert et al., 2017).

La relación entre la sintomatología estudiada y la parasitación por los genotipos/subgenotipos de *G. intestinalis* no resultó significativa en el presente estudio. El subtipo con mayores prevalencias entre la sintomatología tanto intestinal como extraintestinal fue el AII, seguida del subgenotipo ambiguo AI/AII y en menor porcentaje el subgenotipo AI. Sin embargo, se halló una excepción, encontrando una asociación significativa en el caso de aquellos pacientes parasitados con los subgenotipos AII y AI/AII y la presencia de urticarias. Esta asociación no ha sido reportada hasta ahora en la literatura científica, por lo que para demostrar esta tendencia sería necesario realizar un estudio bien diseñado con un tamaño muestral adecuado en pacientes con urticaria y presencia de *G. intestinalis*, en el que se pudiera caracterizar el subgenotipo AII y AI/AII.

Curiosamente, en el presente estudio se halló casi exclusivamente el genotipo A en los pacientes estudiados, sugiriendo que este genotipo y sus subgenotipos más frecuentes, el AII y AI/AII, podrían estar asociados a una la clínica gastrointestinal y extraintestinal crónica, como se ha observado en algunos estudios en los que el subgenotipo AII se ha asociado a pacientes con alteraciones gastrointestinales como diarrea persistente o dolor abdominal (Sahagún et al., 2008; Seguí et al., 2018), siendo el genotipo B asociado en mayor frecuencia a individuos asintomáticos, principalmente niños (Mateo et al., 2014; Muadica et al., 2020). Sin embargo,

Discusión

estudios recientes muestran una mayor distribución de casos sintomáticos parasitados con el genotipo B que con el genotipo A, asociando, algunos de ellos, la infección asintomática por *G. intestinalis* al genotipo A (de Lucio et al., 2015; Flecha et al., 2015; Wang et al., 2019). Por el contrario, los resultados moleculares de múltiples estudios muestran el subgenotipo BIV como el más frecuente tanto en pacientes sintomáticos como en asintomáticos (Goñi et al., 2010; Feng & Xiau, 2011; Ryan & Cacciò, 2013; de Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Muadica et al., 2020). Mientras que en otros estudios se muestra una infección sintomática similar en pacientes parasitados por ambos genotipos (Breathnach et al., 2010; Molina et al., 2011; Kasaei et al., 2018).

Al analizar la sintomatología gastrointestinal en relación con parasitación por *Blastocystis* sp., destaca como el síntoma más frecuente el dolor abdominal, seguido de flatulencias, distensión abdominal, grasa en heces, diarrea y dispepsia, entre otros. Estos resultados concuerdan con los datos reflejados en la literatura científica, siendo el dolor abdominal el síntoma predominante en los individuos parasitados por el protista, seguido de otros como la diarrea (Audebert et al., 2016; El Safadi et al., 2016; Salvador et al., 2016; Kumarasamy et al., 2018; Toro et al., 2018; Delshad et al., 2020; Hamdy et al., 2020). Cabe destacar que los síntomas analizados fueron más frecuentes en el grupo de los pacientes no parasitados, que, en los parasitados por el protista, sin encontrar una asociación significativa entre el parásito y los síntomas. Lo mismo ocurre en diversos estudios, en los que el protista presenta mayores prevalencias en pacientes asintomáticos que en pacientes sintomáticos o con la presencia de TGC (Scanlan et al., 2014; Tito et al., 2019).

Los resultados obtenidos sugieren que *Blastocystis* podría considerarse un microorganismo comensal capaz de colonizar el colon a largo plazo y cuya presencia no sería responsable de la sintomatología gastrointestinal presente en la población

de estudio, como se ha sugerido en múltiples estudios (Scanlan et al., 2014; Krogsgaard et al., 2018; Nieves-Ramírez et al., 2018; Mardani et al., 2019; Reh et al., 2019; Tito et al., 2019; de Boer et al., 2020; Gabrielli et al., 2020a; Stensvold et al., 2020). Sin embargo, el protista podría actuar como oportunista en ciertas condiciones que alteren el sistema intestinal, como la presencia de TGC, otras patologías u otros organismos patógenos, agravando la sintomatología asociada (Abdulsalam et al., 2013).

En el caso de *Blastocystis*, también se analizó su relación con la presencia de sintomatología gastrointestinal cíclica o intermitente hallándose una asociación significativa entre ellos. Este hallazgo apenas se ha analizado en estudios previos, salvo en el realizado por Jones y colaboradores (2009) en el que un paciente parasitado por el ST3 del protista presentó diarrea sanguinolenta intermitente, sin embargo, en el presente estudio no se dio la presencia de este síntoma en ningún paciente. Otro estudio realizado por Valença y colaboradores (2017), dos pacientes con blastocistosis presentaron diarrea intermitente en pacientes portadores del ST2. Además, en un caso clínico publicado por Lee y colaboradores (1990) una paciente parasitada por el protista presentó dolor abdominal y vómitos intermitentes, además de diarrea. Sin embargo, el presente estudio sería el primero en demostrar una asociación significativa entre las variables.

Por otra parte, en el análisis de la sintomatología extraintestinal, al igual que en la gastrointestinal, los pacientes con *Blastocystis* presentaron menos síntomas que los no parasitados. Sin embargo, se confirmó una asociación significativa entre la parasitación por el protista y la presencia de los siguientes síntomas: fatiga crónica, dolor articular y pérdida de peso, sintomatología que ha sido reportada por diversos estudios y casos clínicos (Lee et al., 1990; Wawrzyniak et al., 2013; Rostami et al., 2017b; Roshan et al., 2020). En el caso del dolor articular, varios estudios muestran

Discusión

que el protista es capaz de originar artritis reactiva e inflamatoria, aunque se desconoce el mecanismo por el cual desencadena la patología (Lee et al., 1990; Lakhanpal et al., 1991; Tejera et al., 2012; Alamlah et al., 2020). No obstante, Lee y colaboradores (1990) hallaron múltiples formas vacuolares del protista en el líquido sinovial de la rodilla de una paciente inmunosuprimida, sugiriendo que el tratamiento inmunosupresor podría contribuir a la diseminación sistémica de *Blastocystis* y generar la artritis infectiva. Por otra parte, no se obtuvo una asociación significativa entre la presencia urticarias o trastornos cutáneos y la infección por *Blastocystis*, como se ha reportado en multitud de estudios (Zuel-Fakkar et al., 2011; Verma & Delfanian, 2013; Casero et al., 2015; Lepczyńska et al., 2016; Salvador et al., 2016; Aydin et al., 2019; Bahrami et al., 2019). La etiología por la cual el parásito produce esta condición es desconocida, pero se sugiere la implicación de la alteración del sistema inmunitario o la microbiota intestinal. Algunos de los estudios mencionados muestran que la morfología ameboide y la presencia de los ST1-4 podrían estar relacionados con la presencia de urticarias (Zuel-Fakkar et al., 2011; Casero et al., 2015; Lepczyńska et al., 2016; Salvador et al., 2016; Bahrami et al., 2019). En el presente estudio, no se halló la presencia de la forma ameboide y fue el ST2 el subtipo más frecuente en aquellos pacientes con urticarias, aunque la asociación no resultó significativa, al igual que muestran otros estudios (Vogelberg et al., 2010; Shirvani et al., 2020).

En el presente estudio, no se halló una asociación significativa entre la presencia de la sintomatología estudiada, tanto gastrointestinal como extraintestinal, y los diferentes subtipos de *Blastocystis*, al igual que múltiples estudios publicados en la literatura científica (Forsell et al., 2016; Mardani et al. 2019; Delshad et al., 2020; Salvador et al., 2021).

Como se ha mencionado anteriormente, existe la hipótesis de que la sintomatología podría estar relacionada con la diversidad genética del protista (Tan, 2008; Tan et al., 2010; Scanlan et al., 2012; Pérez et al., 2020), aunque no ha sido demostrada hasta la fecha (Dogruman-Al et al., 2009; Souppart et al., 2009; Delshad et al., 2020; Deng et al., 2021). En el presente estudio fue el ST2 el subtipo que se halló con mayor frecuencia en la mayoría de los síntomas estudiados, aunque la asociación no resultó significativa en ningún caso. Algunos estudios concuerdan con los resultados obtenidos, encontrando el ST2 como el más frecuente en pacientes sintomáticos (Souppart et al., 2009; Roberts et al., 2013), mientras que otros estudios observan una mayor frecuencia del ST1 (Fouad et al., 2011; El Safadi et al., 2013; Delshad et al., 2020; Kim et al., 2020), ST3 (Zuel-Fakkar et al., 2011; Salehi et al., 2021) y ST4 (Domínguez-Márquez et al., 2009; Stensvold et al., 2011; Forsell, et al., 2012; Mattiucci et al., 2016), o consideran al ST7 como un subtipo patógeno (Poirier et al., 2012; Cifre et al., 2018; Yason et al., 2019). También se da el caso de que ciertas investigaciones muestren asociaciones significativas entre diferentes ST y síntomas concretos, como es el caso del estudio de Pérez y colaboradores (2020), en el que se halló una asociación entre el ST1 y dolor abdominal, y entre el ST4 y distensión abdominal.

Por lo tanto, con los resultados obtenidos no es posible corroborar el papel patógeno o comensal de *Blastocystis* en los pacientes estudiados, siendo necesarios más estudios diseñados adecuadamente que investiguen a fondo la interacción del protista con los múltiples factores relacionados con el hospedador, tales como la inmunidad y la microbiota intestinal, entre otros.

6. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO DE PARÁSITOS INTESTINALES

Los diferentes factores de riesgo de infección parasitaria analizados se tomaron de estudios epidemiológicos previos sobre enfermedades parasitarias en países de rentas altas (Fletcher et al., 2012; Horton et al., 2018).

En el análisis de las diferentes variables consideradas, solamente se identificó un factor de riesgo de parasitación intestinal en la población estudiada. El hábito en cuestión fue el contacto habitual con niños/niñas y/o personas discapacitadas en el ámbito familiar, y se dio en aquellos pacientes que presentaron una parasitación en general y, en concreto, una parasitación por *G. intestinalis*.

El contacto con niños/as y/o personas discapacitadas infectadas puede facilitar la transmisión debido a la falta de hábitos higiénicos en ambos grupos de población, ya sea por la corta edad o la falta de educación higiénico-sanitaria en el caso de los niños/as, o por inmovilidad y dependencia en el caso de las personas discapacitadas. Situación que ha sido observada en estudios previos realizados en Irán, Líbano, Egipto, Nepal y Etiopía, entre otros (Tappeh et al., 2010; Osman et al., 2016; Hassanein et al., 2017; Rai et al., 2018; Fentahun et al., 2019). Por lo que es recomendable que las personas convivientes y encargadas del cuidado y educación de estos grupos de población tomen las medidas higiénico-sanitarias necesarias para evitar infecciones.

El resto de las variables, entre las que encontramos la profesión de riesgo, el consumo de frutas y verduras de cultivo ecológico, el contacto frecuente con animales, viajes a países endémicos y el tratamiento crónico con omeprazol, no fueron asociadas significativamente con ningún caso de parasitismo estudiado en el

presente estudio. En contraposición, en un estudio similar realizado por Trelis y colaboradores (2019) en pacientes con presencia de malabsorción a carbohidratos, no se demostró como factor de riesgo el contacto frecuente con niños/as o personas con discapacidad, pero sí que fue significativo el consumo habitual de frutas y verduras compradas como de cultivo ecológico o de pequeños productores, el tener una profesión con contacto directo con seres humanos, y el haber realizado viajes en los últimos años a países o zonas endémicas de parasitosis. Otro estudio realizado por Hidalgo y colaboradores (2019) obtuvo resultados similares, detectando como factores de riesgo para la adquisición de *Blastocystis* el ser originario de África, viajar al extranjero y trabajar en contacto directo con otras personas.

Para finalizar, es necesario prestar atención a los diferentes factores de riesgo reportados en el presente estudio, debido al aumento de las prevalencias de las parasitosis intestinales en la población general y, en especial, en aquellas personas susceptibles de desarrollar TGC u otras patologías, en las que la adquisición de una infección parasitaria producida por *G. intestinalis*, *Blastocystis* sp. u otros parásitos, podría desencadenar o agravar la patología y su sintomatología asociada, y, a falta de una sospecha clínica, diagnóstico y tratamiento adecuado, podría generar complicaciones a largo plazo, empeorando su salud y calidad de vida, y aumentando los costes socio-sanitarios.

VI. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se detallan a continuación las conclusiones extraídas:

1. Los resultados demuestran una elevada tasa de parasitación intestinal no diagnosticada en población con Trastornos Gastrointestinales Crónicos, puesta en evidencia gracias a la combinación de métodos de diagnóstico parasitológico directos e indirectos.
2. La inclusión de métodos moleculares para el diagnóstico del protozoo *G. intestinalis*, ha aumentado la detección de casos respecto a estudios previos, confirmando la sospecha del infradiagnóstico del parásito mediante los métodos convencionales. Sin embargo, para el segundo parásito más frecuente en el presente estudio, *Blastocystis*, la inclusión de la técnica de PCR no ha aportado prevalencias superiores a las obtenidas mediante la microscopía óptica.
3. Ni el sexo, ni la edad influyeron de forma significativa en la prevalencia de parasitación, siendo ligeramente superior en individuos masculinos y en pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 30 años.
4. Destaca de forma significativa la infección por una sola especie parásita o monoparasitismo, producida por los protistas *G. intestinalis* y *Blastocystis*, lo que se correlacionaría con la transmisión por contacto directo con personas o animales infectados, más que por contaminación fecal de agua y alimentos, lo cual ampliaría el espectro de especies patógenas con otros protozoos intestinales comensales.

Conclusiones

5. La caracterización molecular de *G. intestinalis*, a nivel de genotipo y subgenotipo, reveló la mayor prevalencia del genotipo A y el subgenotipo All, lo que sugiere un origen de la infección antroponótico, con vías de transmisión persona-persona, de forma directa o indirecta.
6. La baja prevalencia de *Blastocystis* sp. detectada en los pacientes con TGC y sintomatología gastrointestinal, podría reforzar la hipótesis de su carácter comensal, como parte de una microbiota intestinal rica y diversa. No obstante, seguramente el empleo de técnicas de PCR a tiempo real hubiera revelado un mayor número de casos positivos entre la población estudiada, por lo que no se puede confirmar el papel del parásito en la enfermedad en el ser humano.
7. Revisadas las discrepancias previas en cuanto a la patogenicidad de los subtipos de *Blastocystis*, y junto con los resultados obtenidos, queda sin confirmar la asociación de un subtipo concreto con la enfermedad en el ser humano, probablemente porque independientemente de la genética del parásito, intervengan otros factores relacionados con la competencia inmunológica del hospedador y la composición de la microbiota intestinal.
8. La prevalencia de *G. intestinalis* fue elevada entre los pacientes con TGC, destacando en aquellos con síndromes de malabsorción a carbohidratos, Enfermedad Celíaca y Síndrome de Intestino Irritable, aunque no pudo ser demostrada una asociación significativa entre ellos. Tampoco se halló una relación entre dichas patologías y un genotipo/subgenotipo concreto del parásito.
9. A pesar de una discreta presencia de *Blastocystis* sp. en asociación con los Trastornos Gastrointestinales Crónicos, se ha podido constatar una asociación significativa entre el protista y la Intolerancia/malabsorción a la lactosa.

Además, se halló una asociación significativa entre los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y la presencia del ST1.

10. Los pacientes con *G. intestinalis* presentaron una mayor prevalencia de sintomatología intestinal y extraintestinal que el resto de los individuos estudiados, prevaleciendo aquellos síntomas citados previamente en la literatura para la infección crónica por el parásito; asimismo, se confirmó el carácter intermitente o cíclico de los episodios agudos.
11. Los resultados obtenidos para *Blastocystis* sp., en los que no se pudo demostrar una relación entre el parásito y la sintomatología gastrointestinal estudiada, apoyan la hipótesis de que podría considerarse un microorganismo comensal, capaz de colonizar el colon a largo plazo, u oportunista, aprovechando situaciones de compromiso intestinal para establecerse, complicando la sintomatología preexistente y agravando la situación del paciente con fatiga crónica, dolor articular y pérdida de peso.
12. En el análisis de los factores de riesgo de parasitosis en nuestro entorno, solamente se identificó el contacto habitual con niños/niñas y personas con discapacidad como posible origen de la transmisión, concretamente para la infección por *G. intestinalis*.

2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PROPUESTAS DE FUTURO

Debido a la falta de recursos, los individuos analizados en el presente estudio son muy heterogéneos y constituyen un único grupo de pacientes con TGC y/o sintomatología, faltando un grupo control de voluntarios sanos para poder clarificar el poder patógeno de las especies parásitas identificadas.

Al no tratarse de pacientes reclutados de forma específica y controlada para el estudio de las enteroparasitosis en asociación a un trastorno crónico, el tamaño muestral de los grupos propuestos para los subanálisis ha sido reducido en la mayoría de los casos.

En el futuro, se deberían complementar los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, con estudios específicos de cada una de las patologías estudiadas, que incluyan un tamaño muestral adecuado, el análisis de las mismas variables y la adición de métodos diagnósticos similares para las especies parásitas más prevalentes y la comparación de los resultados con un grupo de individuos sanos. Además, sería interesante incluir un protocolo de seguimiento de los pacientes con estas patologías para observar la mejora tras el correcto tratamiento farmacológico y nutricional.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, M. J., Barkhori, M., Rezaeian, M., Mohebbali, M., Baigi, V., Amiri, S., . . . Samimi, M. (2020). Prevalence and associated risk factors of human intestinal parasitic infections: A population-based study in the southeast of Kerman province, southeastern Iran. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 12. doi:10.1186/s12879-019-4730-8
- Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Khan, A. H., Ahmed, A., Surin, J., & Mak, J. W. (2013). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sabha, Libya. *Parasites & Vectors*, 6, 86. doi:10.1186/1756-3305-6-86
- Abraham, B. P., Ahmed, T., & Ali, T. (2017). Inflammatory bowel disease: Pathophysiology and current therapeutic approaches. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 239, 115-146. doi:10.1007/164_2016_122
- Abulhasan, M., Elshazly, T. A., Eida, M., & Albadry, A. (2013). *Giardia intestinalis* in patients with nonulcer dyspepsia. *Arab Journal of Gastroenterology: The Official Publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology*, 14(3), 126-129. doi:10.1016/j.ajg.2013.08.004
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447-475. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001.
- Adam, R. D., Dahlstrom, E. W., Martens, C. A., Bruno, D. P., Barbian, K. D., Ricklefs, S. M., . . . Nash, T. E. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and pig). *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2498-2511. doi:10.1093/gbe/evt197
- Adell-Aledón, M., Köster, P. C., de Lucio, A., Puente, P., Hernández-de-Mingo, M., Sánchez-Thevenet, P., . . . Carmena, D. (2018). Occurrence and molecular

Bibliografía

- epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in dog populations in Eastern Spain. BMC Veterinary Research, 14(1), 26. doi:10.1186/s12917-018-1353-z
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., . . . Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology, 66(1), 4-119. doi:https://doi.org/10.1111/jeu.12691
- Ahmed, S. A., Guerrero, M., & Karanis, P. (2018). The impact of water crises and climate changes on the transmission of protozoan parasites in Africa. Pathogens and Global Health, 112(6), 281-293. doi:10.1080/20477724.2018.1523778
- Aibinu, I. E., Smooker, P. M., & Lopata, A. L. (2019). *Anisakis* nematodes in fish and shellfish from infection to allergies. International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife, 9, 384-393. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.04.007
- 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(6 Pt B), 772-779. doi:10.1016/j.parint.2016.05.007
- Akkapulu, N., & Abdullazade, S. (2015). Is *Enterobius vermicularis* infestation associated with acute appendicitis?. European Journal of Trauma and Emergency Surgery: Official Publication of the European Trauma Society, 42(4), 465-470. doi:10.1007/s00068-015-0555-3.
- Alamli, L., Abufaied, M., & Al-Allaf, A. (2020). An unusual cause of reactive arthritis with urticarial: A case report. Qatar Medical Journal, 2020(2), 25. doi:10.5339/qmj.2020.25

- Alexeieff, A. (1911). Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales, 71, 296-298.
- Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S. U., Fagbenro-Beyioku, A. F., & Clark, C. G. (2013). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Tropica, 126(1), 11-18. doi:10.1016/j.actatropica.2012.12.011
- Allain, T., & Buret, A. G. (2020). Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. Advances in Parasitology, 107, 173-199. doi:10.1016/bs.apar.2019.12.001
- Allain, T., Amat, C. B., Motta, J., Manko, A., & Buret, A. G. (2017). Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: epithelium, mucus, and microbiota. Tissue Barriers, 5(1), e1274354. doi:10.1080/21688370.2016.1274354
- Allué, I. P. (2015). Actualización en enfermedad celíaca: diagnóstico y actuación clínica y dietética. Nutrición clínica, 9(2), 145-156.
- Amat, C. B., Motta, J., Fekete, E., Moreau, F., Chadee, K., & Buret, A. G. (2017). Cysteine Protease–Dependent mucous disruptions and differential mucin gene expression in *Giardia duodenalis* infection. The American Journal of Pathology, 187(11), 2486-2498. doi:10.1016/j.ajpath.2017.07.009
- Amaya S, A. M., Trejos S, J., & Morales R, E. (2015). *Blastocystis* spp.: Revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. Revista De La Universidad Industrial De Santander. Salud, 47(2), 199-208. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-08072015000200012&lng=en&nrm=iso&tIng=es

Bibliografía

- Andersen, L. O., & Stensvold, C. R. (2016). *Blastocystis* in health and disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective?. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 524-528. doi:10.1128/JCM.02520-15
- Ankarklev, J., Lebbad, M., Einarsson, E., Franzén, O., Ahola, H., Troell, K., & Svärd, S. G. (2018). A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 60, 7-16. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.012
- Arman, M. I. (1991). Arthritis in lambliasis intestinalis (giardiasis) in the adult. *Zeitschrift Fur Rheumatologie*, 50(4), 216-218.
- Ash, L. R., & Orihel, T. C. (2010). *Atlas de parasitología humana* (5ª Edición) (pp. 81-85). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0128-3
- Asociación de Médicos de Sanidad Exterior (AMSE) (2012). Información Epidemiológica. Giardiasis. Epidemiología y situación mundial. Disponible en: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/187-giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial> (acceso 24 de mayo de 2020).
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., & Chabé, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6, 25255. doi:10.1038/srep25255
- Austhof, E., Schaefer, K., Faulkner, J., Bach, L., Riddle, M., & Pogreba-Brown, K. (2020). Knowledge and practices of primary care physicians or general

- practitioners treating post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology*, 20(1), 159. doi:10.1186/s12876-020-01305-z
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2018). Parásitos en los alimentos. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/parasites-food> (acceso 21 de abril de 2020).
- Ávila, J. T., de Vera, A. M., Hernández, C., & Martín Vasallo, P. (1995). Análisis del DNA-II: clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*, 15(S2), 1-117. Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/es-analisis-del-dna-ii-clonar-secuenciar-articulo-X0211699595022870> (acceso 10 de marzo de 2020)
- Axelrad, J. E., Olén, O., Askling, J., Lebwohl, B., Khalili, H., Sachs, M. C., & Ludvigsson, J. F. (2019). Gastrointestinal infection increases odds of inflammatory bowel disease in a nationwide case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 17(7), 1311-1322.e7. doi:10.1016/j.cgh.2018.09.034
- Aydin, M., Yazici, M., Demirkazik, M., Koltas, I.S., Cikman, A., Gulhan, B., Duran, T., Yilmaz, A., & Kara, M. (2019). Molecular characterization and subtyping of *Blastocystis* in urticarial patients in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(10), 450-456. doi:10.4103/1995-7645.269905
- Azcona-Gutiérrez, J. M., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., García-García, C., Soria-Blanco, L. M., Morales, L., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2017). Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. *PloS One*, 12(6), e0178575. doi:10.1371/journal.pone.0178575

Bibliografía

- Azer, S. A., & Akhondi, H. (2020). Gastritis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544250/> (acceso 25 de enero de 2021)
- Bacha, D., Walha, M., Ben Slama, S., Ben Romdhane, H., Bouraoui, S., Bellil, K., & Lahmar, A. (2018). Chronic gastritis classifications. *La Tunisie Medicale*, 96(7), 405-410.
- Bahrami, F., Babaei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T. R., & Abdoli, A. (2019). *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: Review of the current evidences. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(6), 1027–1042. doi:10.1007/s10096-019-03793-8
- Barkhori, M., Rezaeian, M., Kia, E. B., Raeisi, A., Khanaliha, K., Tarighi, F., & Kamranrashani, B. (2016). Prevalence of intestinal parasitic infections in Jiroft, Kerman province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2), 232-238. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28096858>
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime Reports*, 7, 62. doi:10.12703/P7-62
- Behera, B., Mirdha, B. R., Makharia, G. K., Bhatnagar, S., Dattagupta, S., & Samantaray, J. C. (2008). Parasites in patients with malabsorption syndrome: A clinical study in children and adults. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(3), 672-679. doi:10.1007/s10620-007-9927-9
- Berney, D. M., Rampton, D., & van der Walt, J. D. (1994). Giardiasis of the stomach. *Postgraduate Medical Journal*, 70(821), 237-238. doi:10.1136/pgmj.70.821.237

- Berry, A. S. F., Johnson, K., Martins, R., Sullivan, M. C., Farias, C., Putre, A., . . . Beiting, D. P. (2020). Natural infection with *Giardia* is associated with altered community structure of the human and canine gut microbiome. *mSphere*, 5(4), e00670-20. doi:10.1128/mSphere.00670-20
- Bhatnagar, S., Bhan, M. K., George, C., Gupta, U., Kumar, R., Bright, D., & Saini, S. (1992). Is small bowel bacterial overgrowth of pathogenic significance in persistent diarrhea?. *Acta Paediatrica*, 381, 108-113. doi:10.1111/j.1651-2227.1992.tb12382.x
- Blitz, J., Riddle, M. S., & Porter, C. K. (2018). The risk of chronic gastrointestinal disorders following acute infection with intestinal parasites. *Frontiers in Microbiology*, 9(17). doi:10.3389/fmicb.2018.00017
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brandborg, L. L., Tankersley, C. B., Gottlieb, S., Barancik, M., & Sartor, V. E. (1967). Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*, 52(2, Part 1), 143-150. doi:10.1016/S0016-5085(67)80001-5
- Breathnach, A. S., McHugh, T. D., & Butcher, P. D. (2010). Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. *Epidemiology and Infection*, 138(10), 1459-1467. doi:10.1017/S0950268810000208
- Brieva, L., Ara, J. R., Bertol, V., Canellas, A., & del Agua, C. (1998). [Polyneuropathy caused by vitamin B12 deficiency secondary to chronic atrophic gastritis and giardiasis]. *Revista De Neurologia*, 26(154), 1019-1020.

Bibliografía

- Brumpt, E. (1912). *Blastocystis hominis* sp. et formes voisines. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 5, 725-730.
- Bujanda, L., Gutiérrez-Stampa, M. A., Caballeros, C. H., & Alkiza, M. E. (2002). Trastornos gastrointestinales en Guatemala y su relación con infecciones parasitarias. Anales De Medicina Interna, 19(4), 27-30. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-71992002000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Bundy, D. A. P., Appleby, L. J., & Brooker, S. J. (2020). 111 - Nematodes limited to the intestinal tract (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Capillaria philippinensis*, and *Trichostrongylus* spp.). En E. T. Ryan, D. R. Hill, T. Solomon, N. E. Aronson & T. P. Endy (Eds.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition) (pp. 834-839). London: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-323-55512-8.00111-3. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323555128001113>
- Butters, C., Yeoh, D. K., & Curtis, N. (2019). Parasites in human stool: To ignore or not to ignore? The Pediatric Infectious Disease Journal, 38(6S Suppl 1), S47-S51. doi:10.1097/INF.0000000000002323
- Cacciò, S. M., & Sprong, H. (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Experimental Parasitology, 124(1), 107-112. doi:10.1016/j.exppara.2009.02.007
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. International Journal for Parasitology, 32(8), 1023-1030. doi:10.1016/S0020-7519(02)00068-1

- Cacciò, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., & Pozio, E. (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, 38(13), 1523-1531. doi:10.1016/j.ijpara.2008.04.008
- Cacciò, S. M., Lalle, M., & Svärd, S. G. (2018). Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 66, 335-345. doi:10.1016/j.meegid.2017.12.001
- Calderón de la Barca, A. M., Castillo-Fimbres, R. S., Mejía-León, M. E., Quihui-Cota, L., Ochoa-Leyva, A., & Aguayo-Patrón, S. V. (2020). Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathogens*, 12, 37. doi:10.1186/s13099-020-00376-3
- Calero-Bernal, R., Santín, M., Maloney, J. G., Martín-Pérez, M., Habela, M. A., Fernández-García, J. L., . . . Carmena, D. (2020). *Blastocystis* sp. subtype diversity in wild carnivore species from Spain. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(2), 273-278. doi:10.1111/jeu.12772
- Camilleri, M., Lasch, K., & Zhou, W. (2012). Irritable bowel syndrome: Methods, mechanisms, and pathophysiology. the confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(7), 775. doi:10.1152/ajpgi.00155.2012
- Canakis, A., Haroon, M., & Weber, H. C. (2020). Irritable bowel syndrome and gut microbiota. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 27(1), 28-35. doi:10.1097/MED.0000000000000523

Bibliografía

- Caner, A., Zorbozan, O., Tunali, V., Kantar, M., Aydoğdu, S., Aksoylar, S., . . . Turgay, N. (2019). Intestinal protozoan parasitic infections in immunocompromised child patients with diarrhea. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 73(3), 187–192. doi:10.7883/yoken.JJID.2019.054.
- Cardona, G. A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-Crespo, J. C., . . . Carmena, D. (2011). Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, north of Spain. *The Science of the Total Environment*, 412-413, 101-108. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.076
- Carlson, D. W., & Finger, D. R. (2004). Beaver fever arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*, 10(2), 86-88. doi:10.1097/01.rhu.0000120979.11380.16
- Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Paparo, F., Troncone, R., & Iacono, G. (2001). Treatment of giardiasis reverses ‘active’ coeliac disease to ‘latent’ coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13(9), 1101–1105. Disponible en: https://journals.lww.com/eurojgh/Abstract/2001/09000/Treatment_of_giardiasis_reverses__active__coeliac.18.aspx
- Cascais-Figueiredo, T., Austriaco-Teixeira, P., Fantinatti, M., Silva-Freitas, M. L., Santos-Oliveira, J. R., Coelho, C. H., . . . Da-Cruz, A. M. (2019). Giardiasis alters intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) and plasma cytokines levels in children in brazil. *Pathogens*, 9(1), 7. doi:10.3390/pathogens9010007
- 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.
doi:10.1016/j.actatropica.2015.05.004

Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC) (2018). Intervenciones de enfermería para la atención de adultos mayores con fractura de cadera. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México. Disponible en: <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/IMSS-603-13/ER.pdf?platform=hootsuite>. (acceso 19 de marzo de 2020).

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta (2016). Parásitos. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/about.html> (acceso 17 de abril de 2020).

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) , Atlanta (2017). Parasites - *Giardia*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/Giardia/pathogen.html> (acceso 15 de mayo de 2020).

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta (2019). *Blastocystis*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/Blastocystis/index.html> (acceso 17 de febrero de 2020).

Chandramathi, S., Suresh, K., Shuba, S., Mahmood, A., & Kuppusamy, U. R. (2010). High levels of oxidative stress in rats infected with *Blastocystis hominis*. *Parasitology*, 137(4), 605-611. doi:10.1017/S0031182009991351

Chen, T., Chen, S., Wu, H., Lee, T., Lu, Y., Wu, L., . . . Yu, L. C. (2013). Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens*, 5(1), 26. doi:10.1186/1757-4749-5-26

Bibliografía

- Chover, J. L., Borrás, M. J., Gozalbo, M., Muñoz-Antolí, C., Manrique, I., Puchades, C., Salazar, A., & Esteban, J. G. (2010). Parasitosis intestinales en escolares de la ciudad de Valencia. Encuesta de prevalencia. Boletín Epidemiológico Semanal, 18(7), 69-76. Disponible en: http://revista.isciii.es/public/journals/1/pdf_7.pdf (acceso 17 de abril de 2020).
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., . . . Viscogliosi, E. (2017). Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. PLoS One, 12(1), e0169659. doi:10.1371/journal.pone.0169659
- Cifre, S., Gozalbo, M., Ortiz, V., Soriano, J. M., Merino, J. F., & Trelis, M. (2018). *Blastocystis* subtypes and their association with irritable bowel syndrome. Medical Hypotheses, 116, 4-9. doi:10.1016/j.mehy.2018.04.006
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., & Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. Advances in Parasitology, 82, 1-32. doi:10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0
- Coelho, C. H., & Singer, S. M. (2018). Recent advances in the *Giardia*-host relationship reveal danger lurking behind the smile. PLoS Neglected Tropical Diseases, 12(9), e0006625. doi:10.1371/journal.pntd.0006625
- Connor, B. A., Rogova, M., & Whyte, O. (2018). Use of a multiplex DNA extraction PCR in the identification of pathogens in travelers' diarrhea. Journal of Travel Medicine, 25(1). doi:10.1093/jtm/tax087.
- Cooper, M. A., Adam, R. D., Worobey, M., & Sterling, C. R. (2007). Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. Current Biology, 17(22), 1984-1988. doi:10.1016/j.cub.2007.10.020

- Corleto, V. D., Di Marino, V. P., Galli, G., Antonelli, G., Coluccio, C., Di Cerbo, A., . . . Annibale, B. (2018). Improving basic skills in celiac-like disease diagnosis: A case report. *BMC Gastroenterology*, 18(1), 162. doi:10.1186/s12876-018-0894-8
- Coskun, A., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Yasar, M. B., Karaoglu, A. O., & Ertug, S. (2016). *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 916-919. doi:10.1016/j.apjtm.2016.07.018
- Cotton, J. A., Bhargava, A., Ferraz, J. G., Yates, R. M., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014a). *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infection and Immunity*, 82(7), 2772-2787. doi:10.1128/iai.01771-14
- Cotton, J. A., Motta, J., Schenck, L. P., Hirota, S. A., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014b). *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PloS One*, 9(10), e109087. doi:10.1371/journal.pone.0109087
- Crafa, P., Russo, M., Miraglia, C., Barchi, A., Moccia, F., Nouvenne, A., . . . Di Mario, F. (2018). From sidney to OLGA: An overview of atrophic gastritis. *Acta Biomedica: Atenei Parmensis*, 89(8-S), 93-99. doi:10.23750/abm.v89i8-S.7946
- Dacal, E., Köster, P. C., & Carmena, D. (2020). Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(1), 24-31. doi:10.1016/j.eimc.2020.02.005
- Dado, D., Montoya, A., Blanco, M. A., Miró, G., Saugar, J. M., Bailo, B., & Fuentes, I. (2012). Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain:

Bibliografía

- Possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitology Research*, 111(6), 2419-2422. doi:10.1007/s00436-012-3100-x
- de Boer, M. D., Schuurs, T. A., Vermeer, M., Ruijs, Gijs J. H. M., van der Zanden, Adri G. M., Weel, J. F., & Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S. (2020). Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: Results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(1), 197-203. doi:10.1007/s10096-019-03710-z
- De Breucker, S., Pepersack, T., & Cogan, E. (2010). Chronic urticaria in a middle-aged woman. *Acta Clinica Belgica*, 65(3), 190-191. doi:10.1179/acb.2010.039
- de la Cruz, C., & Stensvold, R. (2017). *Blastocystis*. En J.B. Rose & B. Jiménez-Cisneros (Eds.), *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (R. Fayer and W. Jakubowski (Eds.), *Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 3: Protists*), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. Disponible en: <https://www.waterpathogens.org/book/Blastocystis-hominis> (acceso 11 de noviembre de 2020).
- de Lucio, A., Martínez-Ruiz, R., Merino, F. J., Bailo, B., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2015). Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PloS One*, 10(12), e0143981. doi: 10.1371/journal.pone.0143981
- de Lucio, A., Amor-Aramendía, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Anegagrie, M., Arroyo, A., . . . Carmena, D. (2016). Prevalence and genetic diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among school children in a rural area of the Amhara

- region, north-west Ethiopia. *PloS One*, 11(7), e0159992. doi:10.1371/journal.pone.0159992
- de Lucio, A., Bailo, B., Aguilera, M., Cardona, G. A., Fernández-Crespo, J. C., & Carmena, D. (2017). No molecular epidemiological evidence supporting household transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from pet dogs and cats in the province of Álava, northern Spain. *Acta Tropica*, 170, 48-56. doi:10.1016/j.actatropica.2017.02.024
- Debacq, G., Moyano, L. M., Garcia, H. H., Boumediene, F., Marin, B., Ngoungou, E. B., & Preux, P. (2017). Systematic review and meta-analysis estimating association of cysticercosis and neurocysticercosis with epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), e0005153. doi:10.1371/journal.pntd.0005153.
- del Coco, V. F., Molina, N. B., Basualdo, J. A., & Córdoba, M. A. (2017). *Blastocystis* spp.: Avances, controversias y desafíos futuros. *Revista Argentina De Microbiología*, 49(1), 110-118. doi:10.1016/j.ram.2016.08.004
- Delgado, D. A., Lambert, B. S., Boutris, N., McCulloch, P. C., Robbins, A. B., Moreno, M. R., & Harris, J. D. (2018). Validation of digital visual analog scale pain scoring with a traditional paper-based visual analog scale in adults. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. Global Research & Reviews*, 2(3), e088. doi:10.5435/JAAOSGlobal-D-17-00088
- Delshad, A., Saraei, M., Alizadeh, S. A., Niaraki, S. R., Alipour, M., Hosseinbigi, B., . . . Hajjalilo, E. (2020). Distribution and molecular analysis of *Blastocystis* subtypes from gastrointestinal symptomatic and asymptomatic patients in Iran. *African Health Sciences*, 20(3), 1179-1189. doi:10.4314/ahs.v20i3.21

Bibliografia

- 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(2), e1009253. doi:10.1371/journal.ppat.1009253
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., & Fox, M. (2015). Lactose intolerance in adults: Biological mechanism and dietary management. *Nutrients*, 7(9), 8020-8035. doi:10.3390/nu7095380
- Desai, T., & Craig, R. M. (1989). Secretory diarrhea in crohn's disease with concurrent giardiasis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 11(2), 201-203. doi:10.1097/00004836-198904000-00017
- Di Prisco, M. C., Hagel, I., Lynch, N. R., Barrios, R. M., Alvarez, N., & López, R. (1993). Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. *Annals of Allergy*, 70(3), 210-213.
- Di Prisco, M. C., Hagel, I., Lynch, N. R., Jiménez, J. C., Rojas, R., Gil, M., & Mata, E. (1998). Association between giardiasis and allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 81(3), 261-265. doi:10.1016/s1081-1206(10)62823-2
- Doglioni, C., De Boni, M., Cielo, R., Laurino, L., Pelosio, P., Braidotti, P., & Viale, G. (1992). Gastric giardiasis. *Journal of Clinical Pathology*, 45(11), 964-967. doi:10.1136/jcp.45.11.964
- Dogruman-Al, F., Kustimur, S., Yoshikawa, H., Tuncer, C., Simsek, Z., Tanyuksel, M., . . . Boorum, K. (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 724-727. doi:10.1590/S0074-02762009000500011

- Domínguez-Márquez, M. V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M. T., & Borrás, R. (2009). High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*, 105(4), 949-955. doi:10.1007/s00436-009-1485-y
- Dubourg, A., Xia, D., Winpenny, J. P., Al Naimi, S., Bouzid, M., Sexton, D. W., . . . Tyler, K. M. (2018). *Giardia* secretome highlights secreted tenascins as a key component of pathogenesis. *GigaScience*, 7(3), 1-13. doi:10.1093/gigascience/giy003
- Edling, L., Rathsman, S., Eriksson, S., & Bohr, J. (2012). Celiac disease and giardiasis: A case report. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 24(8), 984–987. doi:10.1097/MEG.0b013e328354f3f5
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., & Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - an update 2011-2016. *Water Research*, 114, 14-22. doi:10.1016/j.watres.2017.01.036
- Ehiaghe, A. F., Tاتفeng, Y. M., Ehiaghe, J. I., & Osaretin, U. (2013). Hemoglobin concentration of intestinal parasites infested children in Okada, Edo State, Nigeria. *Open Journal of Epidemiology*, 3(4), 149-152. doi:10.4236/ojepi.2013.34022
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47-52. doi:10.1016/j.mib.2016.07.019.
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., . . . Viscogliosi, E. (2016). Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-

Bibliografia

- center study in France. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 451. doi:10.1186/s12879-016-1776-8
- El Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L., . . . Viscogliosi, E. (2013). Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1203-1206. doi:10.4269/ajtmh.12-0777
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., . . . Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal river basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 164. doi:10.1186/1471-2334-14-164
- El-Badry, A. A., Ghieth, M. A., Ahmed, D. A., & Ismail, M. A. M. (2017). *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* co-infection: Estimated risks and predictive factors in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 47(1), 19-24.
- El-Badry, A. A., Abd El Wahab, Wegdan M., Hamdy, D. A., & Aboud, A. (2018). *Blastocystis* subtypes isolated from irritable bowel syndrome patients and co-infection with *Helicobacter pylori*. *Parasitology Research*, 117(1), 127-137. doi:10.1007/s00436-017-5679-4
- El-Gebaly, N. S. M., Halawa, E. F., Moussa, H. M. E., Rabia, I., & Abu-Zekry, M. (2012). Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. *Parasitology Research*, 111(2), 571-575. doi:10.1007/s00436-012-2869-y
- Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Vedel Nielsen, H., & Bytzer, P. (2014). Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 46(3), 204-209. doi:10.3109/00365548.2013.861609

- Esteghamati, A., Khanaliha, K., Bokharaei-Salim, F., Sayyahfar, S., & Ghaderipour, M. (2019). Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(2), 495-501. doi:10.31557/APJCP.2019.20.2.495.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019a). Cryptosporidiosis. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/cryptosporidiosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf> (acceso 18 de abril de 2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019b). Giardiasis (lambliasis). Annual epidemiological report for 2017. Stockholm. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Giardiasis-lambliasis-annual-epidemiological-report-2017.pdf> (acceso 18 de abril de 2020).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019c). Trichinellosis. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-trichinellosis_0.pdf (acceso 28 de abril de 2020).
- Fang, J., Du, Y. Q., Liu, W. Z., Ren, J. L., Li, Y. Q., Chen, X. Y., . . . Lv, B. (2018). Chinese consensus on chronic gastritis (2017, shanghai). *Journal of Digestive Diseases*, 19(4), 182-203. doi:10.1111/1751-2980.12593
- Faria, C. P., Neves, B. M., Lourenço, Á, Cruz, M. T., Martins, J. D., Silva, A., . . . Sousa, M. d. C. (2020). *Giardia lamblia* decreases NF-κB p65 RelA protein levels and modulates LPS-induced pro-inflammatory response in macrophages. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17. doi:10.1038/s41598-020-63231-0

Bibliografía

- Farthing, M. J. (1993). Diarrhoeal disease: Current concepts and future challenges. pathogenesis of giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87 Suppl 3, 17-21. doi:10.1016/0035-9203(93)90531-t
- Feary, J., Britton, J., & Leonardi-Bee, J. (2011). Atopy and current intestinal parasite infection: A systematic review and meta-analysis. Allergy, 66(4), 569-578. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02512.x
- Fekete, E., Allain, T., Siddiq, A., Sosnowski, O., & Buret, A. G. (2020). *Giardia* spp. and the gut microbiota: Dangerous liaisons. Frontiers in Microbiology, 11, 618106. doi:10.3389/fmicb.2020.618106
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clinical Microbiology Reviews, 24(1), 110-140. doi:10.1128/CMR.00033-10
- Fentahun, A. A., Asrat, A., Bitew, A., & Mulat, S. (2019). Intestinal parasitic infections and associated factors among mentally disabled and non-disabled primary school students, Bahir Dar, Amhara regional state, Ethiopia, 2018: A comparative cross-sectional study. BMC Infectious Diseases, 19(1), 549. doi:10.1186/s12879-019-4165-2
- Fernández, M. I., López, A., Serena, S., & García, L. (2020). Síndrome de malabsorción intestinal. Medicine, 13, 1-8. doi:10.1016/j.med.2020.01.001
- Ferreira, A. I., Garrido, M., & Castro-Poças, F. (2020). Irritable bowel syndrome: News from an old disorder. GE Portuguese Journal of Gastroenterology, 27(4), 255-268. doi:10.1159/000503757
- Figuroa-Lara, M. V., Hernández-Gil, L. V., & Pérez-Gutiérrez, G. E. (2020). Infección por *Blastocystis* spp., en individuos inmunocompetentes e

- inmunocomprometidos. *Kasmera*, 48(2), e48231145.
doi:10.5281/zenodo.3908562
- Flecha, M. J., Benavides, C. M., Tissiano, G., Tesfamariam, A., Cuadros, J., de Lucio, A., . . . Carmena, D. (2015). Detection and molecular characterisation of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba* spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital, Oromia Region, Southern Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health*, 20(9), 1213-1222. doi:10.1111/tmi.12535.
- Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J., & Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420-449. doi:10.1128/CMR.05038-11
- Flynn, S., & Eisenstein, S. (2019). Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis. *The Surgical Clinics of North America*, 99(6), 1051-1062. doi:10.1016/j.suc.2019.08.001
- Ford, A. C., Sperber, A. D., Corsetti, M., & Camilleri, M. (2020). Irritable bowel syndrome. *Lancet*, 396(10263), 1675-1688. doi:10.1016/S0140-6736(20)31548-8
- Forsell, J., Granlund, M., Stensvold, C. R., Clark, C. G., Clark, G. C., & Evengård, B. (2012). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(7), 1689-1696. doi:10.1007/s10096-011-1416-6
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H., & Evengård, B. (2016). High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis*

Bibliografía

- assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 9(1), 370. doi:10.1186/s13071-016-1637-8201
- Fouad, S. A., Basyoni, M. M. A., 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: The Official Publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology*, 12(4), 194-200. doi:10.1016/j.ajg.2011.11.005
- Fouad, S. A., Esmat, S., Basyoni, M. M. A., Farhan, M. S., & Kobaisi, M. H. (2014). Molecular identification of *Giardia intestinalis* in patients with dyspepsia. *Digestion*, 90(1), 63-71. doi:10.1159/000362644
- Gabín-García, L. B., Bartolomé, C., Abal-Fabeiro, J. L., Méndez, S., Llovo, J., & Maside, X. (2017). Strong genetic structure revealed by multilocus patterns of variation in *Giardia duodenalis* isolates of patients from Galicia (NW-Iberian Peninsula). *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 48, 131-141. doi:S1567-1348(16)30539-1 [pii]
- Gabrielli, S., Furzi, F., Fontanelli Sulekova, L., Taliani, G., & Mattiucci, S. (2020a). Parasite epidemiology and control. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00134. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673120300039> (acceso 20 de abril de 2020).
- Gabrielli, S., Furzi, F., Fontanelli Sulekova, L., Taliani, G., & Mattiucci, S. (2020b). Occurrence of *Blastocystis*-subtypes in patients from Italy revealed association of ST3 with a healthy gut microbiota. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00134. doi:10.1016/j.parepi.2020.e00134

- Galgamuwa, L. S., Iddawela, D., & Dharmaratne, S. D. (2018). Prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in relation to undernutrition among children in a tea plantation community, Sri Lanka: A cross-sectional study. *BMC Pediatrics*, 18(1), 13. doi:10.1186/s12887-018-0984-3
- García-Sancho, M. (2010). A new insight into Sanger's development of sequencing: from proteins to DNA, 1943-1977. *Journal of the History of Biology*, 43(2), 265-323. doi:10.1007/s10739-009-9184-1
- Gato Morais, R., Báñez Sánchez, F., Pascual García, J., Fernández Crisóstomo, C., & García Jimenez, C. (1998). Reactive arthritis due to *Giardia lamblia* in a patient with IgA deficiency. *Anales De Medicina Interna*, 15(7), 398-399.
- Gheorghe, C., Cotruta, B., Becheanu, G., Dumbrava, M., & Verban, S. (2017). *Giardia duodenalis* associated with intestinal metaplasia of the stomach. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD*, 26(3), 221. doi:10.15403/jgld.2014.1121.263.gia
- Ghoshal, U. C., & Ranjan, P. (2011). Post-infectious irritable bowel syndrome: The past, the present and the future. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 3, 94-101. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06643.x
- 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 & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18(6), 436-439. doi:10.1007/s100960050314
- Gil, H., Cano, L., de Lucio, A., Bailo, B., de Mingo, M. H., Cardona, G. A., . . . Carmena, D. (2017). Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and

Bibliografía

- Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 50, 62-69. doi:10.1016/j.meegid.2017.02.013
- Goñi, P., Aldana, D. E., Clavel, A., Seral, C., Remacha, M. A., & Castillo, F. J. (2010). Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 28(10), 710-712. doi:10.1016/j.eimc.2010.04.010
- González Otero, A. J. (2010). Inmunoensayos enzimáticos para detectar agentes infecciosos o sus productos: Algunos diseños y aplicaciones. Revista Cubana De Medicina Tropical, 62(3), 167-179. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602010000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es (acceso 27 de marzo de 2020).
- González-Arenas, N. R., Villalobos, G., Vargas-Sánchez, G. B., Avalos-Galarza, C. A., Márquez-Valdelamar, L. M., Ramírez-Miranda, M. E., . . . Maravilla, P. (2018). Is the genetic variability of cathepsin B important in the pathogenesis of *Blastocystis* spp.? Parasitology Research, 117(12), 3935-3943. doi:10.1007/s00436-018-6103-4
- Goodman, M. J., Pearson, K. W., McGhie, D., Dutt, S., & Deodhar, S. G. (1980). Campylobacter and *Giardia lamblia* causing exacerbation of inflammatory bowel disease. Lancet, 2(8206), 1247. doi:10.1016/s0140-6736(80)92504-0
- Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. Clinical Microbiology Reviews, 22(1), 127-145. doi:10.1128/CMR.00026-08

- Gozalbo, M., Guillen, M., Taroncher-Ferrer, S., Cifre, S., Carmena, D., Soriano, J. M., & Trelis, M. (2020). Assessment of the nutritional status, diet and intestinal parasites in hosted Saharawi children. *Children*, 7(12), 264. doi:10.3390/children7120264
- Grazioli, B., Matera, G., Laratta, C., Schipani, G., Guarnieri, G., Spiniello, E., . . . Luzza, F. (2006). *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: A prospective study. *World Journal of Gastroenterology*, 12(12), 1941-1944. doi:10.3748/wjg.v12.i12.1941
- Gunasekaran, T. S., & Hassall, E. (1992). Giardiasis mimicking inflammatory bowel disease. *The Journal of Pediatrics*, 120(3), 424-426. doi:10.1016/s0022-3476(05)80911-4
- Hall, S. N., & Appelman, H. D. (2019). Autoimmune gastritis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 143(11), 1327-1331. doi:10.5858/arpa.2019-0345-RA
- Halliez, M. C. M., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(47), 8974-8985. doi:10.3748/wjg.v19.i47.8974
- Halliez, M. C. M., Motta, J., Feener, T. D., Guérin, G., LeGoff, L., François, A., . . . Buret, A. G. (2016). *Giardia duodenalis* induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(8), 574. doi:10.1152/ajpgi.00144.2015
- Hamdy, D. A., Abd El Wahab, Wegdan Mohamed, Senosy, S. A., & Mabrouk, A. G. (2020). *Blastocystis* spp. and *Giardia intestinalis* co-infection profile in children

Bibliografia

- suffering from acute diarrhea. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(1), 88-98. doi:10.1007/s12639-019-01165-9
- Hammer, K., & Hammer, J. (2020). Valid assessment of carbohydrate intolerance and the need for a distinction to carbohydrate malabsorption. comment on “Roles of lactose and fructose malabsorption and dietary outcomes in children presenting with chronic abdominal pain.” *nutrients* 2019, 11, 3063 doi:10.3390/nu12061546
- Hanevik, K., Dizdar, V., Langeland, N., & Hausken, T. (2009). Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterology*, 9, 27. doi:10.1186/1471-230X-9-27
- Hanevik, K., Wensaas, K., Rortveit, G., Eide, G. E., Mørch, K., & Langeland, N. (2014). Irritable Bowel Syndrome and chronic fatigue 6 years after *Giardia* infection: A controlled prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 59(10), 1394-1400. doi:10.1093/cid/ciu629.
- Hanevik, K., Kristoffersen, E., Mørch, K., Rye, K. P., Sørnes, S., Svård, S., . . . Langeland, N. (2017). *Giardia*-specific cellular immune responses in post-giardiasis chronic fatigue syndrome. *BMC Immunology*, 18(1), 5. doi:10.1186/s12865-017-0190-3
- Hanevik, K., Wik, E., Langeland, N., & Hausken, T. (2018). Transient elevation of anti-transglutaminase and anti-endomysium antibodies in *Giardia* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(7), 809-812. doi:10.1080/00365521.2018.1481522

- Hasan, S. M. T., Maachee, M., Córdova, O. M., Diaz de la Guardia, R., Martins, M., & Osuna, A. (2002). Human secretory immune response to fatty acid-binding protein fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 70(4), 2226-2229. doi:10.1128/iai.70.4.2226-2229.2002
- Hassan, S. M. T., Maache, M., de la Guardia, R. Díaz, Córdova, O. M., García, J. R. G., Galiana, M., . . . Osuna, A. (2005). Binding properties and immunolocalization of a fatty acid-binding protein in *Giardia lamblia*. *The Journal of Parasitology*, 91(2), 284-292. doi:10.1645/GE-3352
- Hassanein, F. I., Shehata, A. I., & Abdul-Ghani, R. (2017). *G. lamblia* and *H. pylori* infections among mentally challenged individuals in rehabilitation centers in Alexandria, Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(7), 577-582. doi:10.3855/jidc.8783
- Heidari, A., & Rokni, M. B. (2003). Prevalence of intestinal parasites among children in day-care centers in Damghan - Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 32(1), 31-34. Disponible en: <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/1974> (acceso 25 de febrero de 2021)
- Herrador, Z., Pérez-Molina, J. A., Henríquez Camacho, C. A., Rodríguez-Guardado, A., Bosch-Nicolau, P., Calabuig, E., Domínguez-Castellano, A., . . . REDIVI Study Group (2020). Imported cysticercosis in Spain: A retrospective case series from the +REDIVI Collaborative Network. *Travel medicine and infectious disease*, 37, 101683. doi:10.1016/j.tmaid.2020.101683.
- Heyworth, M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23, 13. doi:10.1051/parasite/2016013

Bibliografía

- Hidalgo, L., Salvador, F., Sulleiro, E., López, I., Balladares, M., García, E., . . . 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 & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 38(7), 1241-1247. doi:10.1007/s10096-019-03532-z
- Hijjawi, N., Yang, R., Hatmal, M., Yassin, Y., Mharib, T., Mukbel, R., . . . Ryan, U. (2018). Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Experimental Parasitology*, 185, 23-28. doi:10.1016/j.exppara.2018.01.011
- Homan, W. L., & Mank, T. G. (2001). Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology*, 31(8), 822-826. doi:10.1016/s0020-7519(01)00183-7
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., Arbabi, M., & Delavari, M. (2019). *Giardia lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12(1), 3-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441489/pdf/GHFBB-12-003.pdf> (acceso 27 de marzo de 2020).
- Horton, B., Bridle, H., Alexander, C. L., & Katzer, F. (2019). *Giardia duodenalis* in the UK: Current knowledge of risk factors and public health implications. *Parasitology*, 146(4), 413-424. doi:10.1017/S0031182018001683
- Hosni, H., Kamel, M., Kotb, M., & Gheith, M. (2012). Histopathological study of upper gastrointestinal tract for *Helicobacter pylori* and giardiasis in Egyptian children. *The Medical Journal of Cairo University*, 80(2), 283-291. Disponible en:

- <http://erepository.cu.edu.eg/index.php/MJCU/article/view/1027> (acceso 9 de febrero de 2021).
- Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L., & Molyneux, D. H. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*, 373(9674), 1570-1575. doi:10.1016/S0140-6736(09)60233-6
- Hublin, J. S. Y., Maloney, J. G., & Santin, M. (2020). *Blastocystis* in domesticated and wild mammals and birds. *Research in Veterinary Science*, doi:10.1016/j.rvsc.2020.09.031
- Humbert, P., Guichard, A., Bennani, I., & Chiheb, S. (2017). *Giardia duodenalis* and its involvement in skin diseases. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, 144(11), 676-684. doi:10.1016/j.annder.2017.08.002
- Iacob, T., Țățulescu, D. F., Lupșe, M. S., & Dumitrașcu, D. L. (2020). Post-infectious irritable bowel syndrome after a laboratory-proven enteritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(4), 3517-3522. doi:10.3892/etm.2020.9018
- Isaeva, G. S., & Efimova, N. G. (2010). Gastrointestinal giardiasis associated with *Helicobacter pylori*. *Ekspierimental'Naia I Klinicheskaia Gastroenterologiia = Experimental & Clinical Gastroenterology*, (6), 30-34.
- Jadallah, K. A., Nimri, L. F., & Ghanem, R. A. (2017). Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(4), 201-207. doi:10.4292/wjgpt.v8.i4.201
- Jahan, N., Khatoon, R., & Ahmad, S. (2014). A comparison of microscopy and enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of *Giardia lamblia* in human faecal specimens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(11), DC04-06. doi:10.7860/JCDR/2014/9484.5087

Bibliografía

- Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J., & Svärd, S. G. (2010). Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species?. *Gut Microbes*, 1(6), 379-382. doi:10.4161/gmic.1.6.13608
- Jeske, S., Bianchi, T. F., Moura, M. Q., Baccega, B., Pinto, N. B., Berne, M. E. A., & Villela, M. M. (2018). Intestinal parasites in cancer patients in the south of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 78(3), 574-578. doi:10.1590/1519-6984.175364.
- Jiménez, P. A., Jaimes, J. E., & Ramírez, J. D. (2019). A summary of *Blastocystis* subtypes in north and south America. *Parasites & Vectors*, 12(1), 376. doi:10.1186/s13071-019-3641-2
- Jones, M. S., Whipps, C. M., Ganac, R. D., Hudson, N. R., Boorom, K., & Boroom, K. (2009). Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research*, 104(2), 341-345. doi:10.1007/s00436-008-1198-7
- Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., & Addiss, D. G. (2018). Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet*, 391(10117), 252-265. doi:10.1016/S0140-6736(17)31930-X
- Kapczuk, P., Kosik-Bogacka, D., Kupnicka, P., Metryka, E., Simińska, D., Rogulska, K., . . . Baranowska-Bosiacka, I. (2020). The influence of selected gastrointestinal parasites on apoptosis in intestinal epithelial cells. *Biomolecules*, 10(5) doi:10.3390/biom10050674
- Kasaei, R., Carmena, D., Jelowdar, A., & Beiromvand, M. (2018). Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* in children from Behbahan, southwestern Iran. *Parasitology Research*, 117(5), 1425-1431. doi:10.1007/s00436-018-5826-6

- Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Rahim, F., Mahbodfar, H., Salehi, R., Yousefi-Razin, E., & Foroutan, M. (2017). *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitology International*, 66(2), 142-145. doi:10.1016/j.parint.2017.01.005
- Khademvatan, S., Masjedizadeh, R., Yousefi-Razin, E., Mahbodfar, H., Rahim, F., Yousefi, E., & Foroutan, M. (2018). PCR-based molecular characterization of *Blastocystis hominis* subtypes in southwest of Iran. *Journal of Infection and Public Health*, 11(1), 43-47. doi:10.1016/j.jiph.2017.03.009
- Khaled, S., Gantois, N., Ly, A. T., Senghor, S., Even, G., Dautel, E., . . . Viscogliosi, E. (2020). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese school children. *Microorganisms*, 8(9), 1408. doi:10.3390/microorganisms8091408
- Kim, M., Won, E. J., Kim, S. H., Shin, J. H., & Chai, J. (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(3), 321-326. doi:10.3347/kjp.2020.58.3.321
- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., . . . Angulo, F. J. (2015). World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001940. doi:10.1371/journal.pmed.1001940
- Klem, F., Wadhwa, A., Prokop, L. J., Sundt, W. J., Farrugia, G., Camilleri, M., . . . Grover, M. (2017). Prevalence, risk factors, and outcomes of irritable bowel syndrome after infectious enteritis: A systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 152(5), 1042-1054.e1. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.039

Bibliografía

- Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2014). *Giardia*/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32(2), 280-289. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.009
- Kök, M., Çekin, Y., Çekin, A. H., Uyar, S., Harmandar, F., & Şahintürk, Y. (2019). The role of *Blastocystis hominis* in the activation of ulcerative colitis. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 30(1), 40-46. doi:10.5152/tjg.2018.18498
- Kotloff, K. L. (2017). The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. *Pediatric Clinics of North America*, 64(4), 799-814. doi:10.1016/j.pcl.2017.03.006.
- Krasnov, B. R., & Matthee, S. (2010). Spatial variation in gender-biased parasitism: Host-related, parasite-related and environment-related effects. *Parasitology*, 137(10), 1527-1536. doi:10.1017/S0031182010000454
- Krogsgaard, L. R., Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., & Bytzer, P. (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: A population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 13(3), 507-513.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.07.065
- Krogsgaard, L. R., Andersen, L. O', Johannesen, T. B., Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., & Bytzer, P. (2018). Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 9(6), 161. doi:10.1038/s41424-018-0027-2

- Krol, A. (2013). *Giardia lamblia* as a rare cause of reactive arthritis. *Ugeskrift for Laeger*, 175(49A), V05130347.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U. R., Jayalakshmi, P., Samudi, C., Ragavan, N. D., & Kumar, S. (2017). Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis* sp. *PloS one*, 12(8), e0183097. doi:10.1371/journal.pone.0183097
- Kumarasamy, V., Anbazhagan, D., Subramaniyan, V., & Vellasamy, S. (2018). *Blastocystis* sp., parasite associated with gastrointestinal disorders: An overview of its pathogenesis, immune modulation and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 24(27), 3172-3175. doi:10.2174/1381612824666180807101536
- Lagunas-Rangel, F. A., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2019). Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie*, 156, 123-128. doi:10.1016/j.biochi.2018.10.008.
- Lakhanpal, S., Cohen, S. B., & Fleischmann, R. M. (1991). Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis and Rheumatism*, 34(2), 251-253. doi:10.1002/art.1780340227
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., & Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the β -Giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207-213. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.022.

Bibliografia

- Lane, S., & Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(2), 123-147. doi:10.1080/1040-840291046713
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., Thompson, R. C. A., Steuart, R. F., & Sogin, M. L. (2009). Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(6), 504-518. doi:https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00443.x
- Lavelle, A., & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(4), 223-237. doi:10.1038/s41575-019-0258-z
- LeBlanc, C. M., & Birdi, N. (1999). *Giardia lamblia* associated arthritis in a 19-month-old child. *The Journal of Rheumatology*, 26(9), 2066-2067.
- Lebwohl, B., & Rubio-Tapia, A. (2021). Epidemiology, presentation, and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology*, 160(1), 63-75. doi:10.1053/j.gastro.2020.06.098
- Lee, M. G., Rawlins, S. C., Didier, M., & DeCeulaer, K. (1990). Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 49(3), 192-193. doi:10.1136/ard.49.3.192
- Lepczyńska, M., Chen, W., & Dzika, E. (2016). Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.?. *International Journal of Dermatology*, 55(3), 259-264, 266. doi:10.1111/ijd.13064
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: An overview. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 134-143. doi:10.2174/1872213X13666190618124901

- Lewis, S. J., & Heaton, K. W. (1997). Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920-924. doi:10.3109/00365529709011203.
- Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., . . . 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. doi:10.3389/fcimb.2020.544335
- Lim, M. X., Png, C. W., Tay, C. Y. B., Teo, J. D. W., Jiao, H., Lehming, N., . . . Zhang, Y. (2014). Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and Immunity*, 82(11), 4789-4801. doi:10.1128/IAI.02279-14
- Lins, M. A. d. F., Verdi, G. M. X., Veras, A. d. O., Veras, M. d. O., Caetano, L. C., & Ursulino, J. S. (2020). Use of metabolomics to the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Arquivos De Gastroenterologia*, 57(3), 311-315. doi:10.1590/S0004-2803.202000000-57
- Litleskare, S., Rortveit, G., Eide, G. E., Hanevik, K., Langeland, N., & Wensaas, K. (2018). Prevalence of irritable bowel syndrome and chronic fatigue 10 years after *Giardia* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 16(7), 1064-1072.e4. doi:10.1016/j.cgh.2018.01.022
- Liu, J., Ma'ayeh, S., Peirasmaki, D., Lundström-Stadelmann, B., Hellman, L., & Svärd, S. G. (2018). Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal

Bibliografía

- epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence*, 9(1), 879-894. doi:10.1080/21505594.2018.1451284
- Long, H. Y., Handschack, A., König, W., & Ambrosch, A. (2001). *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research*, 87(12), 1029-1030. doi:10.1007/s004360100494
- López, A. C., Fernández, M. I. H., & García, S. Navajas Serena y L. García. (2020). Indicación e interpretación de las pruebas de intolerancia digestiva y sobrecrecimiento bacteriano. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(1), 45-48. doi:10.1016/j.med.2020.01.006
- Ma, L., Qiao, H., Wang, H., Li, S., Zhai, P., Huang, J., & Guo, Y. (2020). Molecular prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in northern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2789-2796. doi:10.1111/tbed.13644
- Ma'ayeh, S. Y., Liu, J., Peirasmaki, D., Hörnaeus, K., Lind, S. B., Grabherr, M., . . . Svärd, S. G. (2017). Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006120. doi:10.1371/journal.pntd.0006120
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (12ª Edición) (pp. 583; 1028-1029). Madrid, España: Pearson Educación. ISBN: 978-84-7829-097-0
- Mahmoud, M. S. E., Salem, A. A., & Rifaat, M. M. A. (2004). Human giardiasis as an etiology of skin allergy: The role of adhesion molecules and interleukin-6. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34(3), 723-737.

- Maloney, J. G., & Santin, M. (2021). Mind the Gap: New Full-Length Sequences of *Blastocystis* Subtypes Generated via Oxford Nanopore Minion Sequencing Allow for Comparisons between Full-Length and Partial Sequences of the Small Subunit of the Ribosomal RNA Gene. *Microorganisms*, 9(5), 997. doi:10.3390/microorganisms9050997
- Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B., & Santin, M. (2019). Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, 118(2), 575-582. doi:10.1007/s00436-018-6149-3
- Maloney, J. G., Jang, Y., Molokin, A., George, N. S., & Santin, M. (2021). Wide Genetic Diversity of *Blastocystis* in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) from Maryland, USA. *Microorganisms*, 9(6), 1343. doi:10.3390/microorganisms9061343
- Manko, A., Motta, J., Cotton, J. A., Feener, T., Oyeyemi, A., Vallance, B. A., . . . Buret, A. G. (2017). *Giardia* co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. *PloS One*, 12(6), e0178647. doi:10.1371/journal.pone.0178647
- Manko-Prykhoda, A., Allain, T., Motta, J., Cotton, J. A., Feener, T., Oyeyemi, A., . . . Buret, A. G. (2020). *Giardia* spp. promote the production of antimicrobial peptides and attenuate disease severity induced by attaching and effacing enteropathogens via the induction of the NLRP3 inflammasome. *International Journal for Parasitology*, 50(4), 263-275. doi:10.1016/j.ijpara.2019.12.011
- Mardani, M., Tavalla, M., & Beiromvand, M. (2019). Higher prevalence of *Blastocystis hominis* in healthy individuals than patients with gastrointestinal symptoms

Bibliografía

- from Ahvaz, southwestern Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 160-164. doi:10.1016/j.cimid.2019.05.018.
- Martínez-Gordillo, M. N., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Montijo-Barrios, E., & Ponce-Macotela, M. (2014). Intraepithelial *Giardia intestinalis*: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*, 93(29), e277. doi:10.1097/MD.0000000000000277
- Mateo, M., Mateo, M., Montoya, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Aguilera, M., . . . Carmena, D. (2014). Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, central Spain. *Medicine*, 93(15), e75. doi:10.1097/MD.0000000000000075
- Matijašić, M., Meštrović, T., Paljetak, H. Č., Perić, M., Barešić, A., & Verbanac, D. (2020). Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2668. doi:10.3390/ijms21082668
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M., & Cancrini, G. (2016). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, 144(3), 635-646. doi:10.1017/S0950268815001697
- McClelland, E. E., & Smith, J. M. (2011). Gender specific differences in the immune response to infection. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 59(3), 203-213. doi:10.1007/s00005-011-0124-3
- McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R., & Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 712-720. doi:10.1128/JCM.02877-13.

- Melo, G. B. d., Malta, F. d. M., Maruta, C. W., Criado, P. R., Castilho, V. L. P., Gonçalves, E. M. d. N., . . . Gryschek, R. C. B. (2019). Characterization of subtypes of *Blastocystis* sp. isolated from patients with urticaria, São Paulo, Brazil. *Parasite Epidemiology and Control*, 7, e00124. doi:10.1016/j.parepi.2019.e00124
- Meloni, D., Sancier, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Chabé, M., Delhaes, L., . . . Viscogliosi, E. (2011). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitology Research*, 109(3), 613-619. doi:10.1007/s00436-011-2294-7
- Messa, A., Köster, P. C., Garrine, M., Gilchrist, C., Bartelt, L. A., Nhampossa, T., . . . Mandomando, I. (2021). Molecular diversity of *Giardia duodenalis* in children under 5 years from the Manhiça district, southern Mozambique enrolled in a matched case-control study on the aetiology of diarrhoea. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), e0008987. doi:10.1371/journal.pntd.0008987
- 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(12), 5019-5026. doi:10.1128/IAI.05632-11
- Misra, V., Misra, S. P., Dwivedi, M., & Singh, P. A. (2006). *Giardia lamblia* trophozoites in gastric biopsies. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 49(4), 519-523.
- Mohammad, S., Mirjalali, H., Asadzadeh, H., & Zali, M. R. (2018a). Can *Giardia* infection impair the diagnostic level of fecal calprotectin in patients with inflammatory bowel disease? A case report. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(3), 505-509.

Bibliografía

- Mohammad, N. A., Mastuki, M. F., Al-Mekhlafi, H. M., Moktar, N., & Anuar, T. S. (2018b). Comparative study of Wheatley's trichrome stain and in-vitro culture against PCR assay for the diagnosis of *Blastocystis* sp. in stool samples. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(1), 127-136.
- Molina, N., Minvielle, M., Grenóvero, S., Salomón, C., & Basualdo, J. (2011). High prevalences of infection with *Giardia intestinalis* genotype B among children in urban and rural areas of Argentina. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 105(4), 299-309. doi:10.1179/136485911X12987676649665
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., . . . Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.e42. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
- Morgan, D. R., Benschoff, M., Cáceres, M., Becker-Dreps, S., Cortes, L., Martin, C. F., . . . Peña, R. (2012). Irritable bowel syndrome and gastrointestinal parasite infection in a developing nation environment. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 343812. doi:10.1155/2012/343812
- Moya-Camarena, S. Y., Sotelo, N., & Valencia, M. E. (2002). Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(3), 255-259. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.255
- Muadica, A. S., Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Hernández-de-Mingo, M., Reh, L., . . . Carmena, D. (2020). Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms*, 8(4), 466. doi:10.3390/microorganisms8040466

- 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 Zambezi province (Mozambique) doi:10.3390/pathogens10030255
- Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) taxonomy database. (s.f.-a). *Blastocystis*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=12967&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (acceso 12 de diciembre de 2020).
- Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) taxonomy database. (s.f.-b). *Giardia intestinalis*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=5741> (acceso 12 de diciembre de 2020).
- Nenoff, P., Domula, E., Willing, U., & Herrmann, J. (2006). [*Giardia lamblia*--cause of urticaria and pruritus or accidental association?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 57(6), 518-522. doi:10.1007/s00105-005-0959-9
- Nieves-Ramírez, M. E., Partida-Rodríguez, O., Laforest-Lapointe, I., Reynolds, L. A., Brown, E. M., Valdez-Salazar, A., . . . Finlay, B. B. (2018). Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *mSystems*, 3(3), 7. doi:10.1128/mSystems.00007-18

Bibliografía

- Ning, C., Hu, Z., Chen, J., Ai, L., & Tian, L. (2020). Epidemiology of *Blastocystis* infection from 1990 to 2019 in China. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 168. doi:10.1186/s40249-020-00779-z
- Not, A., Salvador, F., Goterris, L., Sulleiro, E., López, I., Balladares, M., . . . Molina, I. (2020). Microscopic examination after concentration techniques for *Blastocystis* sp. detection in serial faecal samples: How many samples are needed? *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00137. doi:https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00137
- Nourrisson, C., Scanzj, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Viscogliosi, E., Livrelli, V., Delbac, F., Dapoigny, M., & Poirier, P. (2014). *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PloS One*, 9(11), e111868. doi:10.1371/journal.pone.0111868.
- Oberhuber, G., Kastner, N., & Stolte, M. (1997). Giardiasis: A histologic analysis of 567 cases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(1), 48-51. doi:10.3109/00365529709025062
- 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(3), 115-120. doi:10.1016/j.rce.2018.01.003
- 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(9), e0137327. doi:10.1371/journal.pone.0137327

- Oliveira-Arbex, A. P., David, E. B., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Bittencourt, G. N., & Guimarães, S. (2016). Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: Evidence of high risk for anthroponotic transmission. *Epidemiology and Infection*, 144(7), 1418-1428. doi:10.1017/S0950268815002514
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) (2018). Ranking basado en múltiples criterios para la gestión de riesgos de parásitos transmitidos por alimentos. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/I3649ES> (acceso 17 de abril de 2020).
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004). Camboya protege contra los parásitos al 75% de los niños y se convierte en el primer país que logra la meta de la OMS. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr46/es/> (acceso 27 de abril de 2020).
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020). HelminCIAS transmitidas por el suelo. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (acceso 27 de abril de 2020).
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., . . . 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(3), e0004496. doi:10.1371/journal.pntd.0004496

Bibliografía

- Padukone, S., Mandal, J., Rajkumari, N., Bhat, B. V., Swaminathan, R. P., & Parija, S. C. (2018). Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in jones' medium. *Tropical Parasitology*, 8(1), 33-40. doi:10.4103/tp.TP_4_18
- Painter, J. E., Collier, S. A., & Gargano, J. W. (2017). Association between *Giardia* and arthritis or joint pain in a large health insurance cohort: Could it be reactive arthritis?. *Epidemiology and Infection*, 145(3), 471-477. doi:10.1017/S0950268816002120
- Parija, S. C., & Jeremiah, S. S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Tropical Parasitology*, 3(1), 17-25. doi:10.4103/2229-5070.113894
- Patel, N., & Shackelford, K. (2020). Irritable bowel syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534810/> (acceso 20 de enero de 2021)
- Paulos, S., Köster, P. C., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Cardona, G. A., Fernández-Crespo, J. C., . . . Carmena, D. (2018). Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health*, 65(8), 993-1002. doi:10.1111/zph.12522
- Pérez de Arce, E., Sedano, R., & Quera, R. (2020). [Biomarkers in inflammatory bowel disease]. *Revista Médica De Chile*, 148(3), 362-370. doi:10.4067/S0034-98872020000300362
- Pérez, M. R., Yáñez, C. M., Hernández, A. M., Sustaita, J. J. D., Jiménez, E. G., Andrade, M. R., . . . Gómez, J. O. G. (2020). *Blastocystis* infection frequency and subtype

- distribution in university students. *Heliyon*, 6(12), e05729. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05729
- Petersen, A. M., Stensvold, C. R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Møller, A., Porsbo, L. J., . . . Krogfelt, K. A. (2013). Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48(5), 638-639. doi:10.3109/00365521.2013.780094
- Pimentel, M., & Lembo, A. (2020). Microbiome and its role in irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(3), 829-839. doi:10.1007/s10620-020-06109-5
- Pisarski, K. (2019). The global burden of disease of zoonotic parasitic diseases: Top 5 contenders for priority consideration. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 44. doi:10.3390/tropicalmed4010044
- Plutzer, J., Lassen, B., Jokelainen, P., Djurković-Djaković, O., Kucsera, I., Dorbek-Kolin, E., . . . Karanis, P. (2018). Review of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the eastern part of Europe, 2016. *Euro Surveill*, 23(4), 16-00825. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.16-00825
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, F., & El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002545. doi:10.1371/journal.ppat.1002545
- Posovszky, C., Roesler, V., Becker, S., Iven, E., Hudert, C., Ebinger, F., . . . Warschburger, P. (2019). Roles of lactose and fructose malabsorption and dietary outcomes in children presenting with chronic abdominal pain. *Nutrients*, 11(12), 3063. doi:10.3390/nu11123063

Bibliografía

- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., & Tan, K. S. W. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, 97(5), 386-389. doi:10.1007/s00436-005-1461-0
- Puthia, M. K., Sio, S. W. S., Lu, J., & Tan, K. S. W. (2006). *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and Immunity*, 74(7), 4114-4123. doi:10.1128/IAI.00328-06
- 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-kappaB-dependent manner. *Eukaryotic Cell*, 7(3), 435-443. doi:10.1128/EC.00371-07
- Quincey, C., James, P. D., & Steele, R. J. (1992). Chronic giardiasis of the stomach. *Journal of Clinical Pathology*, 45(11), 1039-1041. doi:10.1136/jcp.45.11.1039
- Rahmoune, H., Boutrid, N., Amrane, M., & B.Bioud. (2017). Triggering Agents for Transient Celiac Disease. *International Journal of Celiac Disease*, 5(3), 127-128. doi:10.12691/ijcd-5-3-5.
- Raj, M., Neupane, G. P., Dhama, D. B., & Paudel, T. P. (2018). Prevalence of intestinal parasitic infestation among hearing and speech impaired children of Banke, Nepal. *Journal of Nepalgunj Medical College*, 16(2), 44-46. doi:10.3126/jngmc.v16i2.24877
- Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M. C., Giraldo, J. C., . . . Casero, R. D. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in south America. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular*

- Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 41, 32-35.
doi:10.1016/j.meegid.2016.03.017
- Rauff-Adedotun, A. A., Mohd Zain, S. N. & Farah Haziqah, M. T. (2020). Current status of *Blastocystis* sp. in animals from Southeast Asia: a review. Parasitology research, 119, 3559–3570. doi:10.1007/s00436-020-06828-8
- Read, C. M., Monis, P. T., & Thompson, R. C. A. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 4(2), 125-130. doi:10.1016/j.meegid.2004.02.001.
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III – Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (2017). Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2016. Disponible en: https://repisalud.isciii.es/bitstream/20.500.12105/6975/7/InformeAnualDelSistema_2017.pdf (acceso 16 de abril de 2020).
- 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. Euro Surveillance, 24(43), 1900241. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.43.1900241
- Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L. E., Ramos-Morales, A., Martínez-Gordillo, M. N., & González-Maciel, A. (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. Scientific Reports, 5(1), 15168. doi:10.1038/srep15168

Bibliografía

- Riveros, M. J., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Fructose consumption and its health implications; fructose malabsorption and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrición Hospitalaria*, 29(3), 491-499. doi:10.3305/nh.2014.29.3.7178
- 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(2), 308-312. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0447
- 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 & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(3), 335-343. doi:10.1007/s10096-012-1746-z
- Robertson, L. J. (2018). Parasites in food: From a neglected position to an emerging issue. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, 71-113. doi:10.1016/bs.afnr.2018.04.003.
- Rodríguez, O. L., Hagel, I., González, Y., Roque, M. E., Vásquez, N., López, E., & Di Prisco, M. C. (2004). Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(2), 68-72. doi:10.1093/tropej/50.2.68.
- Rodríguez-Castro, K. I., Franceschi, M., Noto, A., Miraglia, C., Nouvenne, A., Leandro, G., . . . Di Mario, F. (2018). Clinical manifestations of chronic atrophic gastritis. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*, 89(8-S), 88-92. doi:10.23750/abm.v89i8-S.7921

- Rodríguez-Pérez, E. G., Arce-Mendoza, A. Y., Montes-Zapata, É I., Limón, A., Rodríguez, L. É, & Escandón-Vargas, K. (2019). Opportunistic intestinal parasites in immunocompromised patients from a tertiary hospital in Monterrey, Mexico. *Le Infezioni in Medicina*, 27(2), 168-174.
- Rojo-Marcos, G., & Cuadros-González, J. (2016). Malaria y protozoos intestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(3), 191-204. doi:10.1016/j.eimc.2015.12.009.
- Rosales-Borjas, D. M., Díaz-Rivadeneira, J., Doña-Leyva, A., Zambrano-Villa, S. A., Mascaró, C., Osuna, A., & Ortiz-Ortiz, L. (1998). Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infection and Immunity*, 66(2), 756-759.
- Roshan, N., Clancy, A., Gunaratne, A. W., LeBusque, A., Pilarinos, D., & Borody, T. J. (2020). Two-day enema antibiotic therapy for parasite eradication and resolution of symptoms. *World Journal of Gastroenterology*, 26(26), 3792-3799. doi:10.3748/wjg.v26.i26.3792
- Rostami, A., Gamble, H. R., Dupouy-Camet, J., Khazan, H., & Bruschi, F. (2017a). Meat sources of infection for outbreaks of human trichinellosis. *Food Microbiology*, 64, 65-71. doi:10.1016/j.fm.2016.12.012
- Rostami, A., Riahi, S. M., Haghghi, A., Saber, V., Armon, B., & Seyyedtabaei, S. J. (2017b). The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Parasitology Research*, 116(9), 2361-2371. doi:10.1007/s00436-017-5535-6

Bibliografia

- Rumsey, P., & Waseem, M. (2020). *Giardia lamblia* enteritis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531495/>
- Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12), 943-956. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Ryan, U., Hijjawi, N., Feng, Y., & Xiao, L. (2019). *Giardia*: An under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology*, 49(1), 1-11. doi:10.1016/j.ijpara.2018.07.003
- Saha, T. K., & Ghosh, T. K. (1977). Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*, 72(3), 402-405.
- Sahagún, J., Clavel, A., Goñi, P., Seral, C., Llorente, M. T., Castillo, F. J., . . . Gómez-Lus, R. (2008). Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 27(1), 81-83. doi:10.1007/s10096-007-0404-3
- Sairenji, T., Collins, K. L., & Evans, D. V. (2017). An update on inflammatory bowel disease. *Primary Care*, 44(4), 673-692. doi:10.1016/j.pop.2017.07.010
- Salehi, M., Mardaneh, J., Niazkar, H. R., Minoeianhaghghi, M., Arshad, E., Soleimani, F., & Mohammadzadeh, A. (2021). Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis hominis* isolated from patients in the northeast of Iran. *Journal of Parasitology Research*, 2021, 8821885. doi:10.1155/2021/8821885
- Salem, A. I., El-Taweel, H. A., Madkour, M. A., Abd El-Latif, N. F., & Abd-Elrazeq, E. S. (2019). Irritable bowel syndrome in Egyptian patients: Plausible risk factors and

- association with intestinal protozoa. *Tropical Doctor*, 49(3), 184-188.
doi:10.1177/0049475519837112
- Salinas, J. L., & Vildozola Gonzales, H. (2007). Infección por *Blastocystis*. *Revista De Gastroenterología Del Perú*, 27(3), 264-274. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1022-51292007000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es (acceso 9 de noviembre de 2020)
- 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 & Vectors*, 9(1), 548.
doi:10.1186/s13071-016-1827-4
- Salvador, F., Lobo, B., Goterris, L., Alonso-Cotoner, C., Santos, J., Sulleiro, E., . . . Molina, I. (2021). *Blastocystis* sp. carriage and irritable bowel syndrome: Is the association already established?. *Biology*, 10(4), 340.
doi:10.3390/biology10040340
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061> (acceso 31 de marzo de 2020).
- Sanad, M. M., Darwish, R. A., Nasr, M. E., el-Gammal, N. E., & Emara, M. W. (1996). *Giardia lamblia* and chronic gastritis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 26(2), 481-495.
- Sánchez-Thevenet, P., Carmena, D., Adell-Aledón, M., Dacal, E., Arias, E., Saugar, J. M., . . . Dea-Ayuela, M. A. (2019). High prevalence and diversity of zoonotic and

Bibliografija

- other intestinal parasites in dogs from eastern Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 19(12), 915-922. doi:10.1089/vbz.2019.2468
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Saurabh, K., Nag, V. L., Khera, D., & Elhence, P. (2017). Giardiasis mimicking celiac disease in a patient of common variable immunodeficiency. *Tropical Parasitology*, 7(2), 125-127. doi: 10.4103/tp.TP_45_16
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203-208. doi:10.1016/j.pt.2006.02.015.
- Scanlan, P. D. (2012). *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 28(8), 327-334. doi:10.1016/j.pt.2012.05.001
- Scanlan, P. D., & Stensvold, C. R. (2013). *Blastocystis*: Getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*, 29(11), 523-529. doi:10.1016/j.pt.2013.08.006
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, Hans 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(1), 326-330. doi:10.1111/1574-6941.12396
- 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(12), 4071-4076. doi:10.1128/AEM.00520-15

- Scicluna, S. M., Tawari, B., & Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77-85. doi:10.1016/j.protis.2005.12.001
- Seguí, R., Muñoz-Antoli, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Köster, P. C., de Lucio, A., . . . Carmena, D. (2018). Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá bay, Brazil: A community survey. *Parasites & Vectors*, 11(1), 490. doi:10.1186/s13071-018-3054-7
- Shafiei, Z., Esfandiari, F., Sarkari, B., Rezaei, Z., Fatahi, M. R., & Hosseini Asl, Seyed Mohammad Kazem. (2020). Parasitic infections in irritable bowel syndrome patients: Evidence to propose a possible link, based on a case-control study in the south of Iran. *BMC Research Notes*, 13(1), 264. doi:10.1186/s13104-020-05118-x
- Shaker, D., Anvari, D., Hosseini, S. A., Fakhari, M., Mardani, A., Ziaei Hezarjaribi, H., . . . Gholami, S. (2019). Frequency and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes among patients attending to health centers in Mazandaran, northern Iran. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 43(4), 537-543. doi:10.1007/s12639-019-01123-5
- Shatla, H. M., el-Hodhod, M. T. A., Mohsen, D. M., & Salah el-Din, M. Y. (2004). Potential diagnosis of *Giardia lamblia* infection through specific antibody detection in saliva. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34(2), 621-630.
- Sheikh, S., Asghari, A., Sadraei, J., Pirestani, M., & zare, M. (2020). *Blastocystis* sp. subtype 9: As the first reported subtype in patients with schizophrenia in Iran. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 2, 633–639. doi:10.1007/s42399-020-00285-1

Bibliografía

- Shirvani, G., Fasihi-Harandi, M., Raiesi, O., Bazargan, N., Zahedi, M. J., Sharifi, I., . . . 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(1), 90-96. doi:10.2478/s11686-019-00131-y
- Sierra, M., Hernanz, N., & Alonso, I. Gala y L. (2020). Enfermedad celiaca. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(1), 9-15. doi:10.1016/j.med.2020.01.002
- Singer, S. M., Fink, M. Y., & Angelova, V. V. (2019). Recent insights into innate and adaptive immune responses to *Giardia*. *Advances in Parasitology*, 106, 171-208. doi:10.1016/bs.apar.2019.07.004
- Skotarczak, B. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(3), 411-416. doi:10.26444/aaem/81315
- Soares, R., & Tasca, T. (2016). Giardiasis: An update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of Microbiological Methods*, 129, 98-102. doi:10.1016/j.mimet.2016.08.017
- Solano, L., Acuña, I., Barón, M. A., Morón De Salim, A., & Sánchez, A. (2008). Influencia de las parasitosis intestinales y otros antecedentes infecciosos sobre el estado nutricional antropométrico de niños en situación de pobreza. *Parasitología Latinoamericana*, 63(1-2-3-4), 12-19. doi:10.4067/S0717-77122008000100003
- Sorell, L., Garrote, J. A., Galvan, J. A., Velazco, C., Edrosa, C. R., & Arranz, E. (2004). Celiac disease diagnosis in patients with giardiasis: High value of

- antitransglutaminase antibodies. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(7), 1330-1332. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30906.x
- Souppart, L., Sancier, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., . . . Viscogliosi, E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research*, 105(2), 413-421. doi:10.1007/s00436-009-1398-9
- Sperber, A. D., Dumitrascu, D., Fukudo, S., Gerson, C., Ghoshal, U. C., Gwee, K. A., . . . Whitehead, W. (2017). The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: A Rome foundation working team literature review. *Gut*, 66(6), 1075-1082. doi:10.1136/gutjnl-2015-311240
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2016). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 763-771. doi:10.1016/j.parint.2016.05.015
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2020). Pre-empting pandora's box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology*, 36(3), 229-232. doi:10.1016/j.pt.2019.12.009
- Stensvold, C. R., & van der Giezen, M. (2018). Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in Parasitology*, 34(5), 369-377. doi:10.1016/j.pt.2018.02.004
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S. W., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., . . . Clark, C. G. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93-96. doi:10.1016/j.pt.2007.01.004
- Stensvold, C. R., Christiansen, D. B., Olsen, K. E. P., & Nielsen, H. V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in danish *Blastocystis*-positive patients

Bibliografía

- presenting with acute diarrhea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), 883-885. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0005
- Stensvold, C. R., Alfellani, M., & Clark, C. G. (2012). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 263-273. doi:10.1016/j.meegid.2011.11.002
- Stensvold, C. R., Tan, K. S. W., & Clark, C. G. (2020). *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 36(3), 315-316. doi:10.1016/j.pt.2019.12.008
- Subirats, M., & Borrás, R. (2018). Un parásito emergente de patogenicidad controvertida, *Blastocystis* sp.: ¿Hay que tratar a todos los pacientes?. *Revista Clínica Española*, 218(3), 133-134. doi:10.1016/j.rce.2018.03.003
- Surangsrirat, S., Thamrongwittawatpong, L., Piyaniran, W., Naaglor, T., Khoprasert, C., Taamasri, P., . . . Leelayoova, S. (2010). Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het Thangphaet*, 93 Suppl 6, S119-124.
- Swathirajan, C. R., Vignesh, R., Pradeep, A., Solomon, S. S., Solomon, S., & Balakrishnan, P. (2017). Occurrence of enteric parasitic infections among HIV-infected individuals and its relation to CD4 T-cell counts with a special emphasis on coccidian parasites at a tertiary care centre in South India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35(1), 37-40. doi:10.4103/ijmm.IJMM_16_164.
- Swayne, J. G. (1849). An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *The Lancet*, 54(1362), 368-371. doi:10.1016/S0140-6736(02)70817-9

- Taghipour, A., Bahadory, S., Badri, M., Yadegar, A., Mirsamadi, E. S., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2020). A systematic review and meta-analysis on the co-infection of *Helicobacter pylori* with intestinal parasites: Public health issue or neglected correlation?. *International Journal of Environmental Health Research*, 1-11. doi:10.1080/09603123.2020.1798890
- Tai, W., Hu, P., Wu, J., & Lin, X. (2011). Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in china. *Parasitology Research*, 108(5), 1207-1210. doi:10.1007/s00436-010-2164-8
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639-665. doi:10.1128/CMR.00022-08
- 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(1), 28-35. doi:10.1007/s11908-009-0073-8
- Tandon, B. N., Tandon, R. K., Satpathy, B. K., & Shriniwas, n. (1977). Mechanism of malabsorption in giardiasis: A study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut*, 18(3), 176-181. doi:10.1136/gut.18.3.176
- Tappe, K. H., Mohammadzadeh, H., Khashaveh, S., Rezapour, B., & Barazesh, A. (2011). Prevalence of intestinal parasitic infections among primary school attending students in Barandooz-Chay rural region of Urmia, West Azerbaijan province, Iran in 2008. *African Journal of Microbiology Research*, 5(7), 788-791. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/ajmr> (acceso 25 de febrero de 2021)

Bibliografía

- Tappeh, K. H., Mohammadzadeh, H., Rahim, R. N., Barazesh, A., Khashaveh, S., & Taherkhani, H. (2010). Prevalence of intestinal parasitic infections among mentally disabled children and adults of Urmia, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(2), 60-64.
- Taroncher, S. (2019). Parasitosis intestinales en pacientes con malabsorción a lactosa y/o fructosa. Valoración del efecto de la terapia combinada (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España. Disponible en: <http://roderic.uv.es/handle/10550/71622>
- Tchidjou, H. K., De Matteis, A., Di Iorio, L., & Finocchi, A. (2015). Celiac disease in an adoptive child with recurrent *Giardia* infection. *International Journal of Health Sciences*, 9(2), 193-197. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538898/pdf/ijhs-9-2-193.pdf>
- Tejera, B., Grados, D., Martínez-Morillo, M., & Roure, S. (2012). Reactive arthritis caused by *Blastocystis hominis*. *Reumatología Clínica*, 8(1), 50-51. doi:10.1016/j.reuma.2011.07.008
- Tenorio-Abreu, A., Gil-Tomás, J. J., Martínez-Macías, O., & Colomina-Rodríguez, J. (2013). Comparación entre 2 técnicas de concentración de parásitos (copropack versus mini parasep solvent free). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(5), 347-348. doi:10.1016/j.eimc.2012.10.008
- Thébault, A., Favennec, L., Kooh, P., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., & Villena, I. (2020). Risk factors for sporadic giardiasis: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, 100158. doi:10.1016/j.mran.2020.100158

- Thompson, R. C. A., & Ash, A. (2019). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections - what's new?. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 75, 103951. doi:10.1016/j.meegid.2019.103951
- Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., . . . Raes, J. (2019). Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68(7), 1180-1189. doi:10.1136/gutjnl-2018-316106
- Toro, E. M., Vichido, M. A., Montijo, E., Cervantes, R., Zárate, F., Huante, A., . . . Ramírez, J. A. (2018). *Blastocystis hominis* and chronic abdominal pain in children: Is there an association between them?. *Journal of Tropical Pediatrics*, 64(4), 279-283. doi:10.1093/tropej/fmx060
- Torres, M. F., Uetanabaro, A. P. T., Costa, A. F., Alves, C. A., Farias, L. M., Bambirra, E. A., . . . Nicoli, J. R. (2000). Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 209-215. doi:10.1099/0022-1317-49-3-209
- Toychiev, A., Navruzov, B., Pazylova, D., Davis, N., Badalova, N., & Osipova, S. (2021). Intestinal protozoa and helminths in ulcerative colitis and the influence of anti-parasitic therapy on the course of the disease. *Acta Tropica*, 213, 105755. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105755
- Trelis, M., Taroncher-Ferrer, S., Gozalbo, M., Ortiz, V., Soriano, J. M., Osuna, A., & Merino-Torres, J. F. (2019). *Giardia intestinalis* and fructose malabsorption: A frequent association. *Nutrients*, 11(12), 2973. doi:10.3390/nu11122973

Bibliografía

- Tungtrongchitr, A., Manatsathit, S., Kositchaiwat, C., Ongrotchanakun, J., Munkong, N., Chinabutr, P., . . . Chaicumpa, W. (2004). *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(3), 705-710.
- Valença, C., de Jesus, R., Pereira, R., d'Avila, C. M., Werneck, H., & Carneiro, H. L. (2017). Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from humans from an urban community in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1), 518. doi:10.1186/s13071-017-2458-0
- Vasquez-Rios, G., Machicado, J., Terashima, A., & Marcos, L. (2016). Irritable bowel syndrome and intestinal parasites: A view from South America. *Revista De Gastroenterologia Del Peru: Organo Oficial De La Sociedad De Gastroenterologia Del Peru*, 36 (2), 153-158.
- Vázquez, S., & Gallego, C. (2020). Otras entidades del tubo digestivo que cursan con malabsorción intestinal. linfomas. inmunodeficiencias. sobrecrecimiento bacteriano y miscelánea. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 13, 16-25. doi:10.1016/j.med.2020.01.003
- Verma, R., & Delfanian, K. (2013). *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *The American Journal of the Medical Sciences*, 346(1), 80-81. doi:10.1097/MAJ.0b013e3182801478
- Verweij, J. J., & Stensvold, C. R. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 371-418. doi:10.1128/CMR.00122-13
- Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A. A., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*.

- Molecular and Cellular Probes, 17(5), 223-225. doi:10.1016/S0890-8508(03)00057-4
- Vicén, M. C., Gallego, M. J., Gutiérrez, J., & Aguilar, A. L. (2020). Revisión de actualización de pautas de tratamiento de *H. pylori*. Revista Clínica De Medicina De Familia, 13(1), 101-102. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1699-695X2020000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es (acceso 12 de enero de 2021).
- Vichido-Luna, M. A., Toro-Monjaraz, E. M., Montijo-Barrios, E., Huante-Anaya, A., Cervantes-Bustamante, R., & Ramírez-Mayans, J. A. (2016). *Blastocystis hominis* un agente patógeno controversial en la génesis de enfermedades gastrointestinales y alérgicas. Alergia, Asma e Inmunología pediátricas, 25(3), 78-83. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2016/al163b.pdf> (acceso 9 de febrero de 2021).
- Villa, O. M, Carbonell, A. E., García, O. M. H., Rodríguez, L. W., Triana, F. P., & Fabián, L. G. (2012). *Blastocystis hominis* in symptomatic celiac patients. Acta Gastroenterologica Latinoamericana, 42(3), 175-181.
- Vivancos, V., González-Alvarez, I., Bermejo, M., & González-Alvarez, M. (2018). Giardiasis: Characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. Current Topics in Medicinal Chemistry, 18(15), 1287-1303. doi:10.2174/1568026618666181002095314.
- Vogelberg, C., Stensvold, C. R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U., & Pöhlmann, C. (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitology International, 59(3), 469-471. doi:10.1016/j.parint.2010.03.009

Bibliografia

- Vos, T., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., . . . Murray, C. J. L. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211-1259. doi:10.1016/S0140-6736(17)32154-2
- Wang, Y., Gonzalez-Moreno, O., Roellig, D. M., Oliver, L., Huguet, J., Guo, Y., . . . Xiao, L. (2019). Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasites & Vectors*, 12(1), 432. doi:10.1186/s13071-019-3692-4
- 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(3), 437-442. doi:10.1016/j.parint.2012.02.007
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., & Alaoui, H. E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: An overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(5), 167-178. doi:10.1177/2049936113504754
- Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., & Stange, E. F. (2016). Inflammatory bowel disease. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(5), 72-82. doi:10.3238/arztebl.2016.0072
- Wensaas, K., Langeland, N., Hanevik, K., Mørch, K., Eide, G. E., & Rortveit, G. (2012). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: Historic cohort study. *Gut*, 61(2), 214-219. doi:10.1136/gutjnl-2011-300220

- Wilder-Smith, C. H., Materna, A., Wermelinger, C., & Schuler, J. (2013). Fructose and lactose intolerance and malabsorption testing: The relationship with symptoms in functional gastrointestinal disorders. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 37(11), 1074-1083. doi:10.1111/apt.12306
- Wilson, N. O., Hall, R. L., Montgomery, S. P., & Jones, J. L. (2015). Trichinellosis surveillance--United States, 2008-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)*, 64(SS01), 1-8.
- Wong, Z., Faulder, K., & Robinson, J. L. (2018). Does *Dientamoeba fragilis* cause diarrhea? A systematic review. *Parasitology Research*, 117(4), 971-980. doi:10.1007/s00436-018-5771-4
- Wu, L., Fu, R., Lu, Z., Tang, L., Zhang, F., & Liu, D. (2012). [Expressions and significance of IL-17 and IL-23 in intestinal mucosa of mice infected with *Blastocystis hominis*]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi = Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 24(6), 676-680.
- Wu, Z., Mirza, H., & Tan, K. S. W. (2014a). Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2885. doi:10.1371/journal.pntd.0002885
- Wu, Z., Mirza, H., Teo, J. D. W., & Tan, K. S. W. (2014b). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *BioMed Research International*, 2014, 209163. doi:10.1155/2014/209163
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., & Khan, R. (2010a). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable

Bibliografía

- bowel syndrome criteria. *Parasitology Research*, 107(3), 679-684. doi:10.1007/s00436-010-1918-7
- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., & Khan, R. (2010b). Irritable bowel syndrome is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 106, 1033–1038. doi: 10.1007/s00436-010-1761-x
- Yamamoto-Furusho, J. K., & Torijano-Carrera, E. (2010). Intestinal protozoa infections among patients with ulcerative colitis: Prevalence and impact on clinical disease course. *Digestion*, 82(1), 18-23. doi:10.1159/000273871
- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., & Tan, K. S. W. (2019). Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: In vitro and in vivo studies. *Microbiome*, 7(1), 30. doi:10.1186/s40168-019-0644-3
- Yoshikawa, H., & Iwamasa, A. (2016). Human *Blastocystis* subtyping with subtype-specific primers developed from unique sequences of the SSU rRNA gene. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 785-791. doi:10.1016/j.parint.2016.03.002
- Zdero, M., Cabrera, G., Ponce de León, P., Nocito, I., & Echenique, C. (1997). Parasitosis in an adult population with chronic gastrointestinal disorders. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, 27(2), 67-73.
- Zhang, X., Qiao, J., Wu, X., Da, R., Zhao, L., & Wei, Z. (2011). In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(1), e23-28. doi:10.1016/j.ijid.2011.09.012

- Zhen, Y., Liao, L., & Zhang, H. (2018). Intestinal giardiasis disguised as ulcerative colitis. *Case Reports in Gastrointestinal Medicine*, 2018, 8968976. doi:10.1155/2018/8968976
- Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis*--past and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 61-79. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358179/>
- Zuel-Fakkar, N. M., Abdel, D. M., & Hassanin, O. M. (2011). Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: A case-control study. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(8), 908-910. doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04127.x
- Zugasti, A. (2009). Intolerancia alimentaria. *Endocrinología y Nutrición*, 56(5), 241-250. doi:10.1016/S1575-0922(09)71407-X
- Zuk, M., & McKean, K. A. (1996). Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 26(10), 1009-1024. doi:10.1016/S0020-7519(96)80001-4

VIII. ANEXOS

1. ANEXO 1. Ejemplo de informe de resultados para el paciente

Paciente: Nº Informe/Historia: Fecha: Muestras analizadas: Heces y Saliva
--

ANÁLISIS PARASITOLÓGICO

A) HECES

EXAMEN MICROSCÓPICO

Concentración: **NEGATIVO**. No se detectan quistes de protozoos, ni huevos de helmintos.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (Real time-PCR)

Detección de DNA de *Giardia intestinalis* en heces. **POSITIVO**.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Detección de DNA de *Blastocystis* sp. en heces. **NEGATIVO**.

B) SALIVA

EXAMEN INMUNOLÓGICO

Técnica de Enzimoimmunoensayo (ELISA indirecto) IgA secretora frente a *Giardia intestinalis*.

POSITIVO. Se detectan anticuerpos específicos anti-*Giardia*.

DIAGNÓSTICO: POSITIVO PARA *GIARDIA INTESTINALIS*.

Fdo. Dra. María Trelis Villanueva

Investigadora Principal

- Anticuerpos:
- Biopsias:
- Genética:
- Otras patologías gastrointestinales (SII, EII, gastritis, etc.):
- Familiares con problemas o enfermedades gastrointestinales:
- *H. pylori*:
- Pruebas digestivas realizadas:
 - Colonoscopia: Biopsias:
 - Endoscopia: Biopsias:
 - Gastroscopia: Biopsias:
 - TAC:
- Otras enfermedades:

- Fecha última analítica y alteraciones recurrentes en el tiempo (TSH, anemia, enzimas, PCR, Calprotectina fecal...)

- Picores: Urticarias: Picor anal:
- Piel atópica:
- Dolor articular:
- Cansancio o Fatiga crónica:
- Pérdida de peso acusada:
- Dolores de cabeza/Migrañas:
- Ciclos de síntomas:
- Problemas de salud en la infancia no intestinales:
- Problemas hormonales/ginecológicos/Infertilidad:
- IG intestinal:

- Tratamiento farmacológico/ Complementos /Suplementos:

3. ANEXO 3: Certificado del Comité Ético de Investigación en Humanos

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA Vicerectorat
d'Investigació

D. José María Montiel Company, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 13 de septiembre de 2018, una vez estudiado el proyecto de tesis doctoral titulado:

“Enteroparasitosis asociadas a trastornos gastrointestinales crónicos”, número de procedimiento H1531322418689,

cuya responsable es Dña. Susana Cifre Martínez, dirigida por Dña. Mará Trelis Villanueva, D. José Miguel Soriano del Castillo y Dña. Mónica Gozalbo Monfort,

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a veintiseis de septiembre de dos mil dieciocho.

The image shows the official seal of the Universitat de València, which is circular and contains the university's name and a central emblem. Overlaid on the seal is a blue ink signature, which appears to be the signature of the responsible official mentioned in the text.

4. ANEXO 4: Certificado del Comité de Bioseguridad.

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

M^a Dolores Simó Piera, Técnica Superior de Prevención de Riesgos Laborales, especialidad de Higiene Industrial, y Secretaria del Comité de Bioseguridad, de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité de Bioseguridad de la Universitat de València, el día 30 de Noviembre de 2018, y estudiado el proyecto de investigación titulado: *“Enteroparasitosis asociadas a trastornos gastrointestinales crónicos”*, cuya investigadora principal es María Trelis Villanueva, ha acordado emitir

INFORME FAVORABLE

- Sobre las medidas de contención aplicadas (según Real Decreto 664/1997),
- En el cumplimiento de los principios aplicados de Seguridad e Higiene en el trabajo establecidos en la normativa vigente.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a 30 de Noviembre de 2018



Este certificado se emite de acuerdo a la información aportada por el/la investigador/a principal. Cualquier cambio en las condiciones de trabajo deberá comunicarse previamente a este Comité que, en su caso, emitirá un nuevo certificado.