

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Epidemiología molecular y factores de riesgo de protistas  
enteroparásitos asociados a diarrea en poblaciones pediátricas  
sintomáticas y asintomáticas en España y Mozambique**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Aly Salimo Omar Muadica**

Directores

**David Antonio Carmena Jiménez  
Isabel de Fuentes Corripio**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**TESIS DOCTORAL**

Epidemiología molecular y factores de riesgo de protistas  
enteroparásitos asociados a diarrea en poblaciones  
pediátricas sintomáticas y asintomáticas en España y  
Mozambique

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR:**

**Aly Salimo Omar Muadica**

**Madrid, 2020**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

Epidemiología molecular y factores de riesgo de protistas enteroparásitos asociados a diarrea en poblaciones pediátricas sintomáticas y asintomáticas en España y Mozambique

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aly Salimo Omar Muadica

DIRECTOR

David Antonio Carmena Jiménez e Isabel de Fuentes Corripio







**D. DAVID ANTONIO CARMENA JIMÉNEZ**, Investigador Distinguido del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

**DÑA. ISABEL FUENTES CORRIPIO**, Responsable de la Unidad de Toxoplasmosis y Protozoos Intestinales del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y FACTORES DE RIESGO DE PROTISTAS ENTEROPARÁSITOS ASOCIADOS A DIARREA EN POBLACIONES PEDIÁTRICAS SINTOMÁTICAS Y ASINTOMÁTICAS EN ESPAÑA Y MOZAMBIQUE**” presentada por el graduado en Biología D. **ALY SALIMO MUADICA** ha sido realizada en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Microbiología y Parasitología por la Universidad Complutense de Madrid.

Majadahonda, 30 de junio de 2020

V.º B.º Director

V.º B.º Directora

D. David Antonio Carmena Jiménez

Dña. Isabel de Fuentes Corripio



## Notas

1. Esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación, o envío para publicación, de los siguientes artículos revisados por pares:
  - a) Reh L\*, **Muadica AS\***, Köster PC, Balasegaram S, Verlander NQ, Chércoles ER, Carmena D. Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. Euro Surveill. 2019;24(43).
  - b) **Muadica AS**, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Hernández-de-Mingo M, Reh L, Balasegaram S, Verlander NQ, Ruiz Chércoles E, Carmena D. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). Microorganisms. 2020;8(4).
  - c) **Muadica AS\***, Balasegaram S\*, Beebeejaun K, Köster PC, Bailo B, Hernández-de-Mingo M, Dashti A, Dacal E, Saugar JM, Fuentes I, Carmena D. Risk associations for intestinal parasites in symptomatic and asymptomatic schoolchildren in central Mozambique. Clin Microbiol Infect. 2020; doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.031.
  - d) **Muadica AS\***, Messa Jr AE\*, Dashti A, Santin M, Manjate F, Chirinda P, Garrine M, Vubil D, Acácio S, KösterPC, Bailo B, Nhamossa T, Calero-Bernal R, Mwenda J, Mandomando I, Carmena D. First identification of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) among symptomatic and asymptomatic children in Mozambique. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14:e0008419.
  - e) **Muadica AS**, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Hernández de Mingo M, Balasegaram S, Carmena D. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in symptomatic and asymptomatic school children in Zambézia province (Mozambique). En revisión.

Los autores identificados con un asterisco contribuyeron en igual medida al trabajo citado.

2. Siguiendo las recomendaciones de la Real Academia Española, esta tesis doctoral ha sido escrita utilizando el masculino genérico como mecanismo inclusivo.
3. Siguiendo las recomendaciones del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades para la presentación de datos epidemiológicos, en esta tesis doctoral se ha priorizado el redondeo de valores numéricos con decimales a cifras significativas, con excepción de algunos cálculos estadísticos.



*"Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos".*

**William L. Bragg**



## **Agradecimientos**

La elaboración de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración, el aliento y el compromiso de varias personas. Por lo tanto, expreso toda mi gratitud y aprecio a todos aquellos que, directa o indirectamente, contribuyeron a hacer realidad esta tarea.

Debo agradecer de manera especial, sincera y profunda, a mi director Dr. David Antonio Carmena Jiménez. ¡Muchas gracias! Me diste una oportunidad cuando más la necesitaba, creíste en mí y la confianza depositada me ha permitido completar con éxito esta tesis doctoral. Me siento muy agradecido por todo lo que me enseñaste, por la paciencia que mostraste y por nunca renunciar a mí. El trabajo realizado con rigor y tesón bajo tu orientación ha sido la clave de los buenos resultados que hemos obtenido juntos. Además de enseñarme mucho, te convertiste en un amigo muy importante en el que me inspiró. Quiero agradecer la oportunidad que me brindaste de formar parte de tu equipo de trabajo, que seguro nos permitirá afrontar nuevos y excitantes retos profesionales en el futuro. Es un privilegio trabajar bajo tu liderazgo.

Agradezco también a mi directora Dra. Isabel Fuentes Corripio, para quien no hay gracias suficientes. Las notas dominantes de su orientación fueron la libertad de acción que me permitió, la utilidad de sus recomendaciones y la cordialidad con la que siempre me recibió, todas ellas decisivas para que este trabajo contribuyese a mi desarrollo científico y personal. Como maestra, ella fue la máxima exponente, me abrió horizontes y me enseñó principalmente a pensar. Fue y es fundamental en la transmisión de experiencias, en la creación y consolidación del conocimiento y en mis pequeños éxitos. Como amiga es lo que todos queremos, ella siempre está a nuestro lado sin tener que pedir nada.

Un agradecimiento muy especial y profundo a mi tutora académica, la Dra. Carmen Cuéllar del Hoyo, por el interés, simpatía y presteza con la que atendió todos mis requerimientos, consultas y dudas relacionadas con la tramitación de esta tesis doctoral. Quiero agradecerle su empatía, el tiempo que me dedicó cuando necesité que me escuchara y los sabios consejos prestados. El trabajo es arduo pero su constancia y dedicación para conmigo han sido claves para lograr el éxito que he obtenido. ¡Gracias por ser una gran persona!

Agradezco especialmente a Pamela C. Köster, Begoña Bailo, Alejandro Dashti, Marta Hernández de Mingo y María Aguilera, del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología (CNM-ISCIH). Quiero que sepan que es un honor trabajar con un grupo tan extraordinario de compañeros tan atentos y talentosos. Gracias por todos los logros que

hemos alcanzado y por todas las dificultades que hemos superado juntos. Todos ustedes son los mejores.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Esther Ruiz Chércoles, del Centro de Salud Maria Jesús Hereza (Leganés); a la Dra. Sooria Balasegaram, el Dr. Kazim Beebeejaun y el Dr. Neville Q. Verlander, de la Agencia de Salud Pública de Inglaterra (Reino Unido); a la Dra. Lucia Reh, del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (Suecia); al Dr. Rafael Calero Bernal, de la Facultad de Veterinaria (UCM) y a la Dra. Mónica Santín, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, quienes me brindaron su valiosa ayuda y colaboración en los muestreos de campo en Leganés, el diseño de los cuestionarios epidemiológico, el análisis de datos estadísticos y la revisión del trabajo final.

A Growen Will, Ana “Vicky” Ibarra, Ramón Tanoira “Moncho”, Carla Franch, Elena Dacal, Aida de Lucio, Andrés Darío Tolosa y Néstor Alberto; gracias por vuestra espontaneidad y alegría a la hora de intercambiar información y material, en una clara demostración de amistad y solidaridad.

También dejo una palabra de agradecimiento a los investigadores y técnicos del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología (CNM-ISCI) y de los laboratorios clínicos de los centros médicos colaboradores de Zambézia (Mozambique) por la amabilidad y colaboración prestada siempre que la solicité.

A la Dra. Maria Molina y la Dra. Maria Valderrama, coordinadoras del máster de Microbiología y Parasitología (UCM), un cariñoso agradecimiento.

Agradezco a todos los niños y sus representantes legales su participación voluntaria en este trabajo de tesis doctoral, y a las autoridades del gobierno local (Direcciones de Administración de Salud y de Educación del distrito en Zambézia) y a los líderes comunitarios por posibilitar las distintas etapas del trabajo de campo realizado en Mozambique.

Agradezco a la Universidad Pedagógica de Quelimane (actual, Universidad Licungo), por la concesión de una beca durante mis estudios doctorales, y al Centro Nacional de Microbiología en Majadahonda por abrirme las puertas de esta prestigiosa institución. Finalmente, agradezco al Instituto de Salud Carlos III por la financiación del proyecto de investigación Exp. PI16CIII/00024 (Investigador Principal: David Antonio Carmena Jiménez) que ha permitido el trabajo experimental y de campo necesario para realizar esta tesis doctoral.

A mi papá (en su memoria)

A mi familia

¡Estímulos que me llevaron a buscar una nueva vida cada día, mis agradecimientos por aceptar que me alejase de su compañía por los estudios, dándome la oportunidad de realizarme aún más!





## ÍNDICE



## Índice

Abreviaturas .....	1
Resumen.....	5
Summary .....	9
1. Introducción.....	15
1.1. Protistas. Diversidad.....	15
1.1.1. Protozoos enteroparásitos.....	16
1.1.2. Estramenópilos enteroparásitos .....	17
1.1.3. Microsporidios enteroparásitos .....	18
1.2. Relevancia en salud pública. Consideraciones.....	18
1.3. Características biofísicas de los estadios transmisibles.....	20
1.4. Transmisión.....	22
1.4.1. Transmisión hídrica.....	23
1.4.2. Transmisión animal-persona. Zoonosis .....	24
1.4.3. Transmisión persona-persona.....	26
1.4.4. Transmisión alimentaria .....	27
1.5. Diagnóstico molecular. Aplicaciones y relevancia epidemiológica .....	28
1.6. <i>Giardia duodenalis</i> .....	30
1.6.1. Taxonomía y diversidad genética .....	30
1.6.2. Morfología.....	32
1.6.3. Clínica y patogénesis.....	34
1.6.4. Diagnóstico laboratorial.....	34
1.6.5. Tratamiento y prevención.....	35
1.7. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	36
1.7.1. Taxonomía y diversidad genética .....	37
1.7.2. Morfología.....	39
1.7.3. Clínica y patogénesis.....	40
1.7.4. Diagnóstico laboratorial.....	41
1.7.5. Tratamiento y prevención.....	42
1.8. <i>Entamoeba histolytica</i> .....	42
1.8.1. Taxonomía y diversidad genética .....	43
1.8.2. Morfología.....	45
1.8.3. Clínica y patogénesis.....	46
1.8.4. Diagnóstico laboratorial.....	47
1.8.5. Tratamiento y prevención.....	48
1.9. <i>Blastocystis</i> sp. ....	49

1.9.1. Taxonomía y diversidad genética .....	50
1.9.2. Morfología.....	51
1.9.3. Clínica y patogénesis.....	53
1.9.4. Diagnóstico laboratorial.....	54
1.9.5. Tratamiento y prevención.....	55
1.10. <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	55
1.10.1. Taxonomía y diversidad genética .....	56
1.10.2. Morfología.....	57
1.10.3. Clínica y patogénesis.....	58
1.10.4. Diagnóstico laboratorial.....	59
1.10.5. Tratamiento y prevención.....	60
1.11. Epidemiología de las infecciones por protistas entéricos en España .....	61
1.11.1. Prevalencia en poblaciones humanas.....	61
1.11.2. Diversidad genética en poblaciones humanas .....	63
1.11.3. Limitaciones y necesidades en investigación .....	65
1.12. Epidemiología de las infecciones por protistas entéricos en Mozambique .....	67
1.12.1. Prevalencia en poblaciones humanas.....	67
1.12.2. Diversidad genética en poblaciones humanas .....	69
1.12.3. Limitaciones y necesidades en investigación .....	69
2. Objetivos.....	73
3. Material y métodos.....	77
3.1. Diseño y justificación del proyecto de investigación.....	77
3.2. Consideraciones éticas .....	78
3.3. Estudio en España .....	79
3.3.1. Contexto geopolítico y descripción del área de estudio.....	79
3.3.2. Reclutamiento de centros educativos en Leganés .....	80
3.3.3. Encuesta epidemiológica .....	83
3.4. Estudio en Mozambique.....	84
3.4.1. Contexto geopolítico y descripción del área de estudio.....	84
3.4.2. Reclutamiento de centros educativos en Zambézia.....	86
3.4.3. Reclutamiento de centros de atención médica en Zambézia .....	88
3.4.4. Encuesta epidemiológica .....	88
3.4.5. Preservación de las muestras de heces .....	89
3.5. Extracción y purificación de ADN a partir de muestras fecales .....	89
3.6. Detección y genotipado de protistas entéricos mediante técnicas moleculares .....	90
3.6.1. Detección y genotipado de <i>Giardia duodenalis</i> .....	91

3.6.2. Detección y genotipado de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	93
3.6.3. Diagnóstico diferencial de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	94
3.6.4. Detección y genotipado de <i>Blastocystis</i> sp. ....	94
3.6.5. Detección y genotipado de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	95
3.6.6. Reactivos y procedimientos comunes .....	95
3.7. Análisis de secuencias y estudio filogenético .....	96
3.8. Análisis estadístico .....	97
4. Resultados .....	101
4.1. Muestreo en Leganés, España .....	101
4.1.1. Participación en centros educativos en Leganés.....	101
4.1.2. Datos sociodemográficos de la población escolar muestreada en Leganés.....	102
4.1.3. Prevalencia general de protistas entéricos .....	103
4.1.4. Prevalencia de protistas entéricos en función de la edad .....	104
4.1.5. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro educativo .....	105
4.1.6. Asociación de riesgos. Análisis univariante.....	106
4.1.7. Asociación de riesgos. Análisis multivariante.....	109
4.2. Muestreo en Zambézia, Mozambique.....	111
4.2.1. Participación en centros educativos en Zambézia .....	112
4.2.2. Datos sociodemográficos de la población escolar asintomática muestreada en Zambézia.....	112
4.2.3. Datos sociodemográficos de la población pediátrica sintomática muestreada en Zambézia.....	113
4.2.4. Prevalencia general de protistas entéricos .....	114
4.2.5. Prevalencia de protistas entéricos en función de la edad .....	116
4.2.6. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro educativo .....	117
4.2.7. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro de atención médica .....	119
4.2.8. Prevalencia de protistas entéricos en función del distrito .....	119
4.2.9. Asociación de riesgos. Análisis univariante.....	122
4.2.10. Asociación de riesgos. Análisis multivariante.....	127
4.3. Comparación de la situación epidemiológica en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique) .....	127
4.4. Epidemiología molecular en Leganés, España .....	130
4.4.1. Diversidad genética en <i>Giardia duodenalis</i> .....	130
4.4.2. Diversidad genética en <i>Cryptosporidium</i> spp.....	133
4.4.3. Diversidad genética en <i>Blastocystis</i> sp. ....	135
4.5. Epidemiología molecular en Zambézia, Mozambique .....	136
4.5.1. Diversidad genética en <i>Giardia duodenalis</i> .....	136

4.5.2. Diversidad genética en <i>Cryptosporidium</i> spp.....	145
4.5.3. Diversidad genética en <i>Blastocystis</i> sp. ....	146
4.5.4. Diversidad genética en <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	147
4.6. Comparación de datos moleculares en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique)..	149
5. Discusión.....	159
6. Conclusiones.....	195
7. Bibliografía.....	199
Anexo I. Familias de genotipos de <i>Cryptosporidium</i> spp. descritas en base a secuencias del gen de la glicoproteína de 60 kDa ( <i>gp60</i> ). ....	271
Anexo II. Prevalencia de <i>Giardia duodenalis</i> en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	272
Anexo III. Epidemiología molecular de <i>Giardia duodenalis</i> en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	274
Anexo IV. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	276
Anexo V. Epidemiología molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	278
Anexo VI. Prevalencia de <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	282
Anexo VII. Prevalencia de <i>Blastocystis</i> sp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	284
Anexo VIII. Epidemiología molecular de <i>Blastocystis</i> sp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país. ....	285
Anexo IX. Prevalencia y diversidad molecular de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique. ....	286
Anexo X. Cuestionario epidemiológico usado en la población pediátrica estudiada en España. ....	289
Anexo XI. Cuestionario epidemiológico usado en la población pediátrica estudiada en Mozambique.....	290
Anexo XII. Oligonucleótidos (incluyendo sondas y cebadores) utilizados para la detección y/o caracterización molecular de las especies de protistas entéricos investigadas en el presente estudio.....	291

## Abreviaturas

En el caso de términos ampliamente utilizados en la literatura científica anglosajona se ha mantenido la abreviatura original en inglés para facilitar su identificación y contexto.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**aOR:** Cociente de probabilidad ajustado (*Adjusted odd ratio*)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ASH:** Heterocigosidad de secuencia alélica (*Allelic sequence heterozygosity*)

**AVAD:** Años de vida ajustados por discapacidad

**bg:** Beta-giardina

**BHQ1:** Apagador de agujero negro 1 (*Black hole quencher*)

**BOE:** Boletín Oficial del Estado

**CAM:** Comunidad Autónoma de Madrid

**CEE:** Comunidad Económica Europea

**CNBS:** Comité Nacional de Bioética para la Salud (*Comité Nacional de Bioética para Saúde*)

**CNE:** Centro Nacional de Epidemiología

**CNM:** Centro Nacional de Microbiología

**Ct:** Ciclo umbral (*Cycle treshold*)

**DE:** Desviación estándar

**DI<sub>50</sub>:** Dosis infectiva media (ID<sub>50</sub>: 50% *Infectious dose*)

**EII:** Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD: *Inflammatory bowel disease*)

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

**FAM:** 6-Carboxifluoresceína

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**GBD:** *Global Burden of Disease Study*

**gdh:** Glutamato deshidrogenasa

**GEMS:** *Global Enteric Multicenter Study*

**GloWPa-Crypto:** *Global Waterborne Pathogen for Cryptosporidium*

**gp60:** Glicoproteína de 60 kDa

**HAI:** Prueba de hemaglutinación indirecta (IHA: *Indirect haemagglutination assay*)

**IC 95%:** Intervalo de confianza del 95%

**IFD:** Inmunofluorescencia directa (DFAT: *Direct fluoresescent antibody test*)

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta (IFAT: *Indirect fluorescent antiboy test*)

**ISCIH:** Instituto de Salud Carlos III

**ITS:** Espaciador transcrito interno (*Internal transcriber spacer*)

**LRIP:** Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología

**MAL-ED:** *Consequences for Child Health and Development Project*

**MGB:** Ligando de hendidura menor (*Minor groove binder*)

**MLST:** Tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*)

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**ONU:** Organización de las Naciones Unidas

**OR:** Cociente de probabilidad (*Odds ratio*)

**Pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

**P.e.:** Por ejemplo

**PIB:** Producto interior bruto

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Quantitative, or real-time, polymerase chain reaction*)

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SII:** Síndrome de intestino (o colon) irritable (IBS: *Irritable bowel syndrome*)

**SNP:** Polimorfismos de nucleótido único (*Single nucleotide polymorphism*)

**ssu rARN:** ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (*small subunit ribosomal ribonucleic acid*)

**ST:** Subtipo

**TARGA:** Terapia antirretroviral de gran actividad

**TB:** Tuberculosis

**tpi:** Triosa fosfato isomerasa

**UNICEF:** Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (*United Nations International Children's Emergency Fund*)

**USD:** dólar estadounidense

**VIC:** 2'-Cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**Vs.:** *Versus*



**RESUMEN**  
***SUMMARY***



## Resumen

### **Epidemiología molecular y factores de riesgo de protistas enteroparásitos asociados a diarrea en poblaciones pediátricas sintomáticas y asintomáticas en España y Mozambique**

La diarrea fue la quinta causa de muerte en niños menores de 5 años en el mundo en 2016. Los 6 patógenos entéricos más relevantes causantes de esta condición incluyeron agentes de origen vírico (adenovirus, rotavirus), bacteriano (*Campylobacter*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*) y parasitarios (*Cryptosporidium*). Las infecciones por estos patógenos eran más frecuentes y graves en áreas desfavorecidas de países de renta baja y media caracterizadas por acceso limitado a agua potable, condiciones higiénico-sanitarias inadecuadas y servicios de saneamiento insuficientes. Además de *Cryptosporidium*, los protozoos *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* también contribuyen significativamente a la carga de enfermedad diarreica global, además de estar asociados a desnutrición, retraso del crecimiento y déficit cognitivo en los niños afectados. Otros protistas, como el estramenópilo *Blastocystis* o el microsporidio *Enterocytozoon bieneusi*, tienen una patogenicidad incierta o causan infecciones oportunistas en individuos inmunodeprimidos. El papel de los niños asintomáticos en la epidemiología de estos protistas ha sido insuficientemente estudiado tanto en países de renta baja y media como en los de renta alta.

El presente trabajo de investigación pretende determinar y comparar, mediante el uso de técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación Sanger, la prevalencia, frecuencia y diversidad genética de las principales especies de protistas entéricos asociadas a diarrea en poblaciones pediátricas sintomáticas y asintomáticas de la Comunidad Autónoma de Madrid (España) y de la provincia de Zambézia (Mozambique). De forma complementaria, se han identificado, mediante análisis estadísticos de regresión logística univariante y multivariante, factores asociados con protección o un mayor riesgo de infección frente a estos microorganismos en los contextos epidemiológicos de ambos países, y se ha caracterizado su transmisión dinámica.

Los resultados obtenidos demostraron que la infección/colonización por protistas entéricos era frecuente en niños aparentemente sanos tanto en España como en Mozambique. Este hecho tiene importantes connotaciones epidemiológicas, ya que los niños portadores asintomáticos pueden actuar como focos de infección inadvertida en grupos vulnerables como otros niños, ancianos o individuos inmunocomprometidos. La población pediátrica investigada en Mozambique presentaba mayores tasas de parasitación/colonización

por al menos una especie de protista (54% vs. 28%), de infecciones mixtas (12% vs. 4%) y de infección por *Giardia duodenalis* (42% vs. 17%) que su homónima en España. Por el contrario, las prevalencias de *Cryptosporidium* spp. (1% vs. 1%), *Blastocystis* sp. (18% vs. 14%) y *Enterocytozoon bieneusi* (0,3% vs. 0%) eran muy similares en ambos países. En Mozambique, *Entamoeba histolytica* no fue hallada, pero sí *Entamoeba dispar* (11%). Ambas especies no fueron investigadas en España.

Los análisis de asociación de riesgos demostraron que, en España, la detección de una especie de protista entérico estaba positivamente asociada con la presencia de una segunda o tercera especie, indicando una fuente de infección común. Este hecho sugería eventos de transmisión por contacto directo persona-persona en microfocos locales de naturaleza oportunista bajo condiciones ambientales favorables. Por el contrario, la evidencia de asociación entre especies de protistas era mucho más limitada en Mozambique, sugiriendo la existencia de fuentes de infección alternativas de origen hídrico, alimentario y zoonótico animal-persona indicativas de una elevada contaminación ambiental. Estos análisis también revelaron que la colonización por *Blastocystis* sp. seguía un patrón acumulativo directamente proporcional a la edad de los niños investigados tanto en España como en Mozambique. El mismo efecto fue observado para *Entamoeba dispar* en la población pediátrica mozambiqueña. Estos datos apoyarían la naturaleza esencialmente no patógena de *Blastocystis* sp. y *Entamoeba dispar*.

Respecto a la información molecular, la diversidad de protistas entéricos (tanto en especies como en variantes genéticas) era mucho mayor en los niños de Zambézia que en los niños de Leganés. Este hecho estaría en consonancia con las elevadas tasas de infección y reinfección halladas en Mozambique, propias de escenarios epidemiológicos de alta prevalencia. Los datos obtenidos para *Giardia duodenalis* apoyarían la existencia de eventos de recombinación genética en este parásito. No se hallaron diferencias observables en la distribución de especies/genotipos de los protistas objeto de estudio en las poblaciones de niños sintomáticos y asintomáticos analizadas en ambos países, sugiriendo que la variante genética del protista considerado no es un factor esencial para desencadenar la transición entre infección y enfermedad. Por otra parte, los animales domésticos constituían una fuente significativa de infecciones humanas por protistas entéricos (confirmadas molecularmente para *Cryptosporidium felis*, sospechadas para *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp.) en Mozambique, pero no en España.

Este estudio demuestra que la alta prevalencia de protistas entéricos observada en Mozambique estaba estrechamente ligada a las deficientes infraestructuras de agua potable y

saneamiento, y por lo tanto a las condiciones de pobreza y falta de recursos, de este país. Además, pone de manifiesto la urgencia de promover estudios moleculares dirigidos a determinar la presencia y diversidad molecular de los protistas objeto de estudio en muestras de origen animal y medioambiental, esenciales para identificar fuentes de infección y vías de transmisión. Por último, los datos epidemiológicos y moleculares generados apoyan la propuesta de considerar, en menor o mayor medida, a *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba dispar*, *Blastocystis* sp. y *Enterocytozoon bieneusi* como organismos patobiontes.



## Summary

### **Molecular epidemiology and risk factors for enteric protists associated to diarrhoea in symptomatic and asymptomatic paediatric populations in Spain and Mozambique**

Diarrhoea was the fifth cause of death in children under five years old in 2016 globally. The six most relevant enteric pathogens causing this condition included viral (adenovirus, rotavirus), bacterial (*Campylobacter*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Shigella*), and parasitic (*Cryptosporidium*) agents. Infections by these pathogens were more frequent and severe in unfavoured settings in low- and medium-income countries characterised by limited access to safe drinking water, poor hygiene, and insufficient sanitary services. Besides *Cryptosporidium*, other protozoa such as *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica* are also major contributors to the global burden of diarrhoeal disease. In addition, infections by these pathogens have been linked to childhood growth failure and cognitive impairment. Other protists, including the stramenopile *Blastocystis* or the microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, have an unclear pathogenic significance or cause opportunistic infections in immunocompromised individuals. The role of asymptomatic children in the epidemiology of these protist species have been insufficiently investigated either in low- and medium-income countries or high-income countries.

The main goals of the present study were to determine and compare, by using molecular-based methods including PCR and Sanger sequencing, the prevalence, frequency and genetic diversity of the main protist species associated to diarrhoea in asymptomatic and symptomatic paediatric populations in the Autonomous Region of Madrid (Spain) and the Zambézia province (Mozambique). Additionally, variables potentially associated to protection or higher risk of infection by these microorganisms were assessed by univariate and multivariate logistic regression analyses in the epidemiological context of both countries, and their dynamic transmission was subsequently characterised.

Obtained results demonstrated that infection/colonization by enteric protists were common in apparently healthy children in Spain and Mozambique. This finding has important epidemiological consequences, as asymptomatic carriers can act as unnoticed sources of infection for vulnerable people including other children, the elderly, and immunocompromised individuals. The paediatric population surveyed in Mozambique showed higher rates of parasitization/colonization by at least one protist species (54% vs. 28%), of mixed infections (12% vs. 4%), and of infection by *Giardia duodenalis* (42% vs. 17%) that its counterpart in

Spain. On the contrary, the prevalence rates for *Cryptosporidium* spp. (1% vs. 1%), *Blastocystis* sp. (18% vs. 14%), and *Enterocytozoon bieneusi* (0,3% vs. 0%) were similar in both countries. In Mozambique, *Entamoeba histolytica* was not found, but *Entamoeba dispar* was detected in 11% of the participating children. None of these two species were investigated in Spain.

Risk association analyses revealed that, in Spain, detection of a given protist species was positively linked to the presence of a second or third species, indicative of a common infection route. This finding suggested the occurrence of person-to-person transmission events in local microfoci of opportunistic nature taking place under favourable environmental conditions. On the contrary, evidence of protist species associations was much weaker in Mozambique, suggesting the occurrence of alternative transmission pathways including waterborne, foodborne, and zoonotic animal-to-person contact, all of them indicative of high environmental contamination. These analyses also showed that colonization by *Blastocystis* sp. was directly proportional to the age of the children both in the Spanish and Mozambican paediatric populations under study. This very same trend was also observed for *Entamoeba dispar* in Mozambique. Together, these data support the notion that *Blastocystis* sp. and *Entamoeba dispar* are primarily non-pathogenic microorganism.

Regarding molecular data, the diversity of enteric protists (in terms of number of species and genetic variants) was much higher in children in Mozambique than in children in Spain. This finding agreed well with the elevated rates of infections and reinfections detected in the former country, featuring a highly prevalent epidemiological scenario. Molecular data supported the occurrence of genetic recombination within *Giardia duodenalis*. No obvious differences in the distribution of protist species/genotypes were noticed between symptomatic and asymptomatic children in Spain and Mozambique, suggesting that the genetic variant of the considered agent was not an essential factor to trigger the transition between infection and disease. On the other hand, regular contact with domestic animals constituted a significant source of human infections by enteric protists (molecularly confirmed for *Cryptosporidium felis*, suspected for *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp.) in Mozambique, but not in Spain.

This study demonstrated that the high prevalence of enteric protist species detected in Mozambique were strongly linked with insufficient access to safe drinking water and sanitary facilities, and, therefore, to poverty and lack of resources. Additionally, the study highlights de urgent need to promote molecular epidemiological studies aimed at investigating the presence and molecular diversity of the enteric protist under study in animal and environmental samples. This information is essential to identify source of infections and transmission

pathways. Finally, epidemiological and molecular data generated here provide evidence supporting the notion that *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba dispar*, *Blastocystis* sp., and *Enterocytozoon bieneusi* should be considered, in a more or lesser extent, as pathobiont organisms.





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1. Introducción

### 1.1. Protistas. Diversidad

Protista (protistas), Fungi (hongos), Animalia (animales) y Plantae (plantas) constituyen los cuatro reinos en los que se clasifican los organismos eucariotas, a los que habría que añadir los dos reinos procariotas Bacteria y Archaea (Cavalier-Smith, 2004; Parfrey *et al.*, 2006). Sin embargo, esta clasificación ha sido cuestionada por algunos autores que proponen la escisión del reino Protista en dos nuevos reinos independientes denominados Protozoa y Chromista, con lo que el número total de reinos sería de 7 (Ruggiero *et al.*, 2015). En cualquier caso, los protistas constituyen un grupo basal (parafilético) de microorganismos extremadamente heterogéneo del cual se derivan los reinos Fungi, Animalia y Plantae. Al no ser un grupo monofilético, no tienen características específicas que los definan y distingan en su conjunto, por lo que muchas de éstas son compartidas por organismos de los reinos Fungi, Animalia o Plantae.

Los protistas son principalmente unicelulares, aunque las algas rojas (rodofíceas) y las algas pardas (feofíceas) pueden alcanzar un grado de organización muy próximo al tisular. En cuanto al tipo de nutrición, pueden ser autótrofos (por fotosíntesis) o heterótrofos por ingestión (fagótrofos) o por absorción osmótica (osmótrofos). La reproducción puede ser asexual (estrictamente clonal) o sexual, con gametos e intercambio de material genético, siendo frecuentes las especies que alternan ambos ciclos en su desarrollo (Goldsmith y Heyneman, 1989). Respecto a su hábitat, ninguno de ellos está específicamente adaptado a la existencia en el aire, de modo que los que no son directamente acuáticos se desarrollan en ambientes terrestres húmedos o en el medio interno de otros organismos.

Aunque la mayoría de las especies de protistas son de vida libre o simbioses mutualistas o comensales, algunos de ellos son parásitos causantes de importantes enfermedades infecciosas humanas. Es por ejemplo el caso de la malaria (causada por parásitos del género *Plasmodium*) y la tripanosomiasis (causada por parásitos del género *Trypanosoma*), ambas transmitidas por insectos vectores (Büscher *et al.*, 2017; Ashley *et al.*, 2018). Los protistas más relevantes que parasitan o colonizan el tracto intestinal humano pertenecen a seis grupos taxonómicamente diferentes: dentro del filo Sarcomastigophora se incluirían los protozoos flagelados del subfilo Mastigophora y los protozoos con seudópodos del subfilo Sarcodina; a continuación estarían los representantes de los filos Apicomplexa y

Microsporidia, los ciliados del filo Ciliophora y, finalmente, los integrantes del filo Stramenopila (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales grupos de protistas que causan enfermedad en humanos.

Filo	Subfilo	Géneros más representativos	Enfermedad o síntomas clínicos en humanos
Sarcomastigophora (con flagelos, pseudópodos o ambos)	Mastigophora (con flagelos)	<i>Leishmania</i>  <i>Trypanosoma</i>  <i>Giardia</i> <i>Dientamoeba</i> <i>Trichomonas</i>	Leishmaniosis visceral, cutánea o mucocutánea Enfermedad del sueño, enfermedad de Chagas Diarrea Colitis Vaginitis
	Sarcodina (con pseudópodos)	<i>Entamoeba</i>  <i>Naegleria</i> , <i>Acanthamoeba</i> <i>Babesia</i>	Disentería, absceso amebiano Meningoencefalitis, queratitis, encefalitis Bebesiosis
Apicomplexa		<i>Plasmodium</i> <i>Isospora</i> <i>Sarcocystis</i> <i>Cryptosporidium</i> <i>Toxoplasma</i>	Malaria Diarrea Diarrea Diarrea Abortos, encefalitis
		<i>Enterocytozoon</i> <i>Encephalitozoon</i>	Diarrea Diarrea, encefalitis, queratoconjuntivitis
		<i>Balantioides</i>	Diarrea
Ciliophora (con cilios)			
Stramenopila	Opalinata	<i>Blastocystis</i>	Diarrea

### 1.1.1. Protozoos enteroparásitos

Hasta el momento se han descrito más de 50.000 especies de protozoos (Englund y Sher, 1988). Exceptuando algunos grupos de mohos mucilaginosos, todos ellos corresponden a microorganismos unicelulares, de distribución ubicua, que presentan las características eucariotas más primitivas. La mayoría de estas especies son de vida libre, pero todos los animales superiores incluyendo el hombre están colonizados/infectados en su tracto intestinal por al menos una especie protozoaria a lo largo de su vida. En cuanto a su estructura, los estadios parasitarios que se alimentan y multiplican activamente en el lumen intestinal del hospedador se denominan frecuentemente trofozoítos. Estas células suelen estar desprotegidas (sin cubierta rígida) y muchas poseen capacidad de desplazamiento mediante flagelos o prolongaciones citoplasmáticas denominadas pseudópodos. Las estructuras con membranas protectoras o paredes gruesas (quistes) resistentes a los agentes ambientales

constituyen la forma de transmisión e infectiva de estos patógenos. La forma de reproducción más común es mediante fisión binaria, aunque algunas formas pueden también hacerlo por división asexual múltiple. Otros grupos, como los apicomplejos, alternan ciclos de división asexual y sexual. Todos los protozoos son heterótrofos (Goldsmith y Heyneman, 1989).

La mayoría de las especies enteropatógenas más relevantes para el hombre son miembros de los filos Sarcomastigophora (*Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*) y Apicomplexa (*Cryptosporidium* spp.) (Tabla 1). Estos microorganismos presentan marcadas diferencias en la forma en que ejercen su potencial patogénico, pudiendo variar desde la invasión celular del epitelio intestinal del hospedador, la adhesión en su superficie o la simple permanencia de forma libre en el lumen intestinal (Stensvold, 2019). En infecciones con cargas parasitarias elevadas la presencia del parásito (p.e. *G. duodenalis*) puede interferir en los procesos de digestión y absorción intestinal de nutrientes y afectar negativamente al estado nutricional del hospedador. Un factor clave que determina la virulencia de estas infecciones es el estado inmunológico de la persona infectada. Por ejemplo, *Cryptosporidium* spp. causa habitualmente trastornos digestivos leves o moderados autolimitados en personas inmunocompetente sanas, pero puede ser mortal en individuos inmunodeprimidos (Certad et al., 2017).

#### 1.1.2. Estramenópilos enteroparásitos

Los estramenópilos (también denominados heterocontos) son una de las principales líneas evolutivas de los eucariotas. Sus representantes son principalmente algas que varían en tamaño desde diatomeas unicelulares (el componente principal del plancton marino) a algas laminares gigantes. Uno de los miembros de este grupo, el oomiceto *Phytophthora infestans*, origino el tizón tardío de la patata causante de la gran hambruna que devastó Irlanda entre 1845–1849 (Ross, 2002). Muchos estramenópilos son flagelados unicelulares o producen células con flagelos en alguno de sus estadios de desarrollo, por ejemplo, en gametos o zoosporas. De hecho, el término heteroconto hace referencia al diferente tamaño de los dos flagelos característicos de estos microorganismos.

*Blastocystis* sp. es el único estramenópilo capaz de causar infección en humanos. Inicialmente descrito en la primera década del siglo XX (Alexieff, 1911), este organismo fue considerado como un comensal habitual en el tracto intestinal del hombre durante décadas. Aunque su potencial patogénico aun no ha sido completamente esclarecido, un número creciente de estudios clínicos y epidemiológicos han asociado su presencia con trastornos intestinales incluyendo diarrea y síndrome de intestino irritable (SII) (Rostami et al., 2017).

También se ha descrito su relación con manifestaciones extraintestinales como la urticaria (Bahrami *et al.*, 2019).

### 1.1.3. Microsporidios enteroparásitos

Los integrantes del filo Microsporidia son parásitos intracelulares obligados. Inicialmente descritos como una rama escindida tempranamente de los eucariotas, estudios estructurales, bioquímicos, moleculares y filogenéticos posteriores demostraron que estos microorganismos formadores de esporas eran en realidad hongos (Hirt *et al.*, 1999; Keeling y Fast, 2002). Desde su descubrimiento en 1857, más de 1.200 especies de microsporidios han sido descritas en una gran variedad de hospedadores vertebrados e invertebrados (Wittner, 1999). Al menos 17 de ellas pueden infectar el tracto intestinal humano, siendo las más importantes *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* (Weiss y Becnel, 2014). Antes de 1985, los casos de microsporidiosis humana eran sólo esporádicamente reportados, pero con el inicio de la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) estos microorganismos emergieron como patógenos oportunistas asociados a diarrea e infecciones sistémicas en personas con síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA). Con la mejora de las técnicas de diagnóstico, nuevas formas clínicas (infecciones) fueron identificadas en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido, niños, viajeros e incluso usuarios de lentes oculares de contacto, lo que contribuyó al reconocimiento pleno de los microsporidios como patógenos humanos (Deplazes *et al.*, 2000; Didier *et al.*, 2004).

En individuos inmunocompetentes las infecciones por microsporidios suelen cursar con diarreas leves-moderadas autolimitadas. En pacientes inmunodeficientes, *E. bieneusi* es causa frecuente de diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso. Más raramente, el parásito puede afectar los tractos biliar y respiratorio (Kotler y Orenstein, 1998). Al contrario que *E. bieneusi*, las infecciones por *Encephalitozoon* spp. suelen estar asociadas a diferentes síndromes incluyendo sinusitis, queratoconjuntivitis, encefalitis o hepatitis (Kotler y Orenstein, 1998). La transmisión materno-fetal de estos parásitos ha sido demostrada en primates no humanos, carnívoros y roedores, pero no en el hombre (Didier *et al.*, 2000).

## 1.2. Relevancia en salud pública. Consideraciones

Los protistas presentes en el tracto intestinal del hombre y otras especies animales reciben diferente atención en función de su capacidad de causar manifestaciones clínicas y enfermedad. Algunos de ellos, como los protozoos entéricos *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica*, son inequívocamente reconocidos como importantes patógenos que

contribuyen significativamente a la carga de enfermedad diarreica global, principalmente en áreas desfavorecidas de países de renta baja y media caracterizadas por acceso limitado a agua potable, condiciones higiénico-sanitarias inadecuadas y servicios de saneamiento insuficientes (Omarova *et al.*, 2018). En estas condiciones de precariedad y pobreza, los niños menores de 5 años representan la población más vulnerable y expuesta a estas infecciones y soportan, por tanto, las mayores tasas de morbimortalidad (Kotloff *et al.*, 2013; Korpe *et al.*, 2018). A modo de ejemplo, *Cryptosporidium* spp. es la segunda causa de muerte por diarrea, por detrás de las infecciones por rotavirus, en niños del África subsahariana y el sudeste asiático (Kotloff *et al.*, 2013). Además, la giardiosis, la criptosporidiosis y la amebiosis son enfermedades debilitantes que causan retraso en el desarrollo físico y cognitivo de los niños afectados, por lo que su impacto socioeconómico en áreas endémicas tiene connotaciones mucho más profundas que las meramente infecciosas (Savioli *et al.*, 2006). Estos patógenos son también causa de preocupación creciente en países de renta alta, donde están frecuentemente asociados a brotes de enfermedad de origen hídrico o alimentario, así como a un número significativo de ingresos hospitalarios, principalmente en viajeros y población migrante (Fletcher *et al.*, 2012).

Otros patógenos, como los microsporidios *E. bienersi*, *E. intestinalis* y *E. cuniculi*, parecen actuar más como patógenos oportunistas, siendo principalmente detectados en individuos inmunodeprimidos o inmunosuprimidos incluyendo pacientes con VIH/SIDA, pacientes en tratamiento oncológico o receptores de trasplante de órgano sólido (Didier, 2005; Didier y Weiss, 2006). Este grupo de patógenos suele estar ausente o en tasas de infección bajas en población asintomática.

El papel patogénico de otros microorganismos como *Blastocystis* sp. o *D. fragilis* es más incierto. Ambos parásitos son frecuentes en población general aparentemente sana tanto en países de renta baja como alta. Sin embargo, en ausencia de otras infecciones, *Blastocystis* sp. y *D. fragilis* han sido relacionados con diversos trastornos digestivos incluyendo SII y episodios de diarrea (Rostami *et al.*, 2017). Finalmente, otros protistas entéricos son considerados comensales apatógenos que forman parte, en mayor o menor medida, de la comunidad microbiana intestinal. Es el caso por ejemplo de muchas especies de amebas incluyendo *Entamoeba coli* y *Entamoeba dispar*.

No obstante, esta percepción puede ser engañosa. Hasta el 90% de las infecciones por *E. histolytica* son subclínicas y no causan daño aparente en el hospedador (Blessmann *et al.*, 2003). En áreas endémicas, *G. duodenalis* ha sido descrita más prevalentemente en poblaciones asintomáticas que en poblaciones con diarrea (Krumkamp *et al.*, 2015), mientras que *Cryptosporidium* spp. es un hallazgo relativamente frecuente en individuos

aparentemente sanos (Hossain *et al.*, 2019). Para reflejar esta diversidad de interacciones entre microorganismos eucariotas intestinales y el hospedador, algunos autores han sugerido que el término “simbionte” debe ser usado para describir todas las asociaciones de mutualismo, comensalismo y parasitismo (Andersen y Stensvold, 2016). Considerados de forma conjunta, estos hechos claramente demuestran que el curso de las infecciones por protistas entéricos es el resultado de un balance en el que intervienen múltiples factores dependientes tanto del parásito (carga parasitaria, especie/genotipo, virulencia, resistencia antimicrobiana, capacidad de modular el sistema inmune del hospedador) como del hospedador (edad, estado inmunológico, coinfecciones, otras patologías).

Conviene recordar además que el tracto intestinal es el lugar de interacción fundamental entre el sistema inmunitario del hospedador y la plétora de microorganismos presentes en él, sean éstos simbioses o patógenos. Mediante sus interacciones, tanto los enteroparásitos como la comunidad bacteriana intestinal pueden alterar la fisiología y capacidad de respuesta inmunitaria de este complejo ecosistema microbiano y decidir el curso de una infección (Leung *et al.*, 2018; Rath *et al.*, 2018). Por ejemplo, un simbionte intestinal puede ser patógeno si consigue desequilibrar el balance, en términos cuantitativos y cualitativos, del equilibrio microbiano habitual (disbiosis) para inducir enfermedad. Por el contrario, el mismo simbionte actuará como comensal si es la microbiota intestinal la que es capaz de inhibir su tasa de replicación, su capacidad invasiva o su acceso a nutrientes (Lukeš *et al.*, 2015; Filyk y Osborne, 2016). En este sentido, el término “patobionte”, inicialmente acuñado para describir bacterias comensales que bajo ciertos estímulos ambientales pueden ser patógenas (Round y Mazmanian, 2009), bien puede ser aplicable a algunos protistas entéricos como *Blastocystis* sp., *D. fragilis* o incluso *G. duodenalis* (Bartelt y Platts-Mills, 2016). Es de esperar que las nuevas tecnologías, como la secuenciación de segunda generación, ayuden a desentrañar las intrincadas interacciones entre parásitos, microbiota intestinal y el sistema inmunológico del hospedador y definir con más claridad la patogenicidad y significancia real en salud pública de los primeros (Parfrey *et al.*, 2011).

### **1.3. Características biofísicas de los estadios transmisibles**

Durante su ciclo biológico, todas las especies de protistas que infectan el tracto digestivo del hombre y otros animales generan formas de resistencia (quistes, ooquistes, esporas) que representan el estadio transmisible e infeccioso de estos organismos. Estas estructuras se excretan con las heces del hospedador y son especialmente resilientes a una gran variedad de condiciones ambientales adversas, permitiendo su dispersión. Todas ellas comparten una serie

de características bioquímicas y físicas que explican la extraordinaria ubicuidad de estos organismos en el medio (particularmente suelos y aguas superficiales) y son esenciales para comprender su epidemiología y modos de transmisión (Carmena, 2010; Dumètre *et al.*, 2012).

En primer lugar, estos microorganismos adoptan estrategias adaptativas y reproductoras basadas en tasas de fecundidad extremadamente elevadas para maximizar sus probabilidades de supervivencia y transmisión. A modo de ejemplo, la intensidad de la infección media por *C. parvum* en bovinos ha sido estimada en 2–1.000 ooquistes/g de heces, con un máximo de  $1 \times 10^{6-8}$  ooquistes/g de heces en el pico de infección en terneros (Castro-Hermida *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que una vaca adulta genera hasta 40 kg/día de heces, y que la excreción de ooquistes en un animal infectado puede durar 3–12 días, estos datos ilustran claramente el impacto ambiental que supone la infección por *Cryptosporidium* spp. En humanos, las tasas de excreción medias estimadas para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* son de  $1 \times 10^{5-7}$  ooquistes/día y  $1 \times 10^9$  quistes/día, respectivamente (Chappell *et al.*, 1996). En el caso de *E. histolytica*, esta cantidad ha sido estimada en  $4,5 \times 10^7$  quistes/día (Cornick y Chadee, 2017), mientras que en *E. bienesi*, la tasa de excreción media estimada varía de  $2 \times 10^2$  a  $1 \times 10^5$ /g de heces en niños asintomáticos (Mungthin *et al.*, 2005).

En segundo lugar, las formas de resistencia de estos microorganismos pueden mantener su viabilidad e infectividad durante periodos prolongados en aguas superficiales (Smith *et al.*, 2006) y suelos en condiciones de humedad y temperatura adecuadas (Santamaría y Toranzos, 2003). Por ejemplo, los quistes de *G. duodenalis* y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. pueden sobrevivir entre 2–6 meses en aguas a menos de 10 °C. El incremento de temperatura compromete la viabilidad de los (oo)quistes, particularmente a partir de los 37 °C (Ives *et al.*, 2007). Los quistes de *G. duodenalis* y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. pueden ser completamente inactivados mediante incubación por encima de los 50 °C durante al menos 10 min. Además, los ooquistes de *Cryptosporidium* (pero no los quistes de *G. duodenalis*) son capaces de resistir periodos de congelación a –20 °C durante 24 h. En el caso de las esporas de microsporidios, se ha podido determinar que pueden permanecer viables hasta un año a temperaturas de 10 °C a 30 °C. Sin embargo, por encima de esta temperatura la infectividad es reducida (Li *et al.*, 2003). Estas estructuras de resistencia son también sensibles a ciclos de congelación/descongelación, la desecación y la exposición a la radiación solar (King *et al.*, 2007).

En tercer lugar, las estructuras de resistencia de estos protistas son de pequeño tamaño (por lo general < 15 µm de diámetro). Como consecuencia, poseen bajas velocidades de sedimentación (0,03–10 m/día) en matrices acuáticas y pueden permanecer en suspensión

en la columna de agua durante periodos de tiempo significativos (Medema *et al.*, 1998). Además, los (oo)quistes y esporas de estos microorganismos pueden atravesar los filtros convencionales usados en las plantas de tratamiento de aguas, incluso cuando éstas son adecuadamente operadas y mantenidas (Betancourt y Rose, 2004), con el consiguiente riesgo de brotes de enfermedad gastrointestinal de transmisión hídrica en la población abastecida. Estas características tienen importantes implicaciones para las empresas responsables de proveer agua potable a las redes de suministro para consumo público, así como para las instituciones y organismos responsables de garantizar su calidad e inocuidad (Carmena, 2010).

En cuarto lugar, los quistes de *Blastocystis* sp. (Zaki *et al.*, 1996), *E. histolytica* (Jarrol *et al.*, 1984), *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. (Betancourt y Rose, 2004) son resistentes a los tratamientos de desinfección por cloración en las concentraciones y tiempos de exposición comúnmente utilizados en el tratamiento de aguas destinadas al consumo humano. Este hecho indica que el tratamiento de agua basado únicamente en cloración es insuficiente para la inactivación de las formas de resistencia de estos patógenos (Carmena *et al.*, 2007), debiendo ser complementado por otros métodos como la ozonización y la irradiación con luz ultravioleta.

En quinto y último lugar, todos los protistas entéricos mencionados son altamente infectivos. Las dosis infectivas medias ( $DI_{50}$ ) asociadas a estos patógenos son bajas, estimándose en el rango de 9–1.042 ooquistes en el caso de *Cryptosporidium* spp. (DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999; Chappell *et al.*, 2006), de 25–100 quistes en el caso de *G. duodenalis* (Smith *et al.*, 2006) y de 1.000 quistes en el caso de *E. histolytica* (Plorde, 2004).

### 1.4. Transmisión

La ruta de transmisión de todos los protistas entéricos es siempre fecal-oral. Un hospedador susceptible (humano o animal) adquirirá el parásito tras ingerir de forma accidental quistes, ooquistes o esporas viables presentes en cualquier sustancia o material contaminado con restos fecales. La infección se originará tras el desenquistamiento/germinación de estas estructuras de resistencia en el tracto intestinal del nuevo hospedador para dar paso al estadio vegetativo correspondiente (ver secciones 1.6.2, 1.7.2, 1.8.2, 1.9.2, y 1.10.2). La ingestión de (oo)quistes y esporas puede ocurrir de forma indirecta a través de agua o alimentos contaminados, o por contacto directo con personas/animales infectados. El grado en que cada una de estas vías contribuye a causar enfermedad en el hombre depende de factores geográficos, socioeconómicos y epidemiológicos, pero, por regla general, se acepta que los casos esporádicos (es decir, no provenientes de brotes de enfermedad) atribuidos a estos

patógenos son adquiridos principalmente vía hídrica, seguido por contacto con animales de producción (o sus heces), contacto persona-persona, vía alimentaria y, finalmente, por contacto con animales de compañía (Innes *et al.*, 2020). En cualquier caso, y siguiendo las premisas del concepto de salud única (Zinsstag *et al.*, 2012; Stark *et al.*, 2015), para conocer la epidemiología de estos parásitos es de vital importancia determinar su dinámica de transmisión, así como el rango de hospedadores naturales y su potencial zoonótico (Blake y Betson, 2017).

#### 1.4.1. Transmisión hídrica

Las especies de protistas más relevantes transmisibles por agua que pueden causar infección en humanos son *Acanthamoeba* spp., *Balantioides coli*, *Blastocystis* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *E. histolytica*, *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *Cystoisospora belli*, *Naegleria fowleri*, *Sarcocystis* spp. y *Toxoplasma gondii* (Esposito *et al.*, 2012; Omarova *et al.*, 2018). De ellos, *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* fueron responsable, respectivamente, del 63% y el 37% de los brotes de transmisión hídrica mundiales asociados tanto al consumo de agua de red como al uso de aguas recreativas (piscinas y parques acuáticos) documentados en el periodo 2011–2016 (Efstratiou *et al.*, 2017). Solo en EEUU, *G. duodenalis* fue el agente etiológico causante de 3 de cada 4 brotes hídricos reportados en el país ente 1971–2011, afectando a más de 41.000 personas (Adam *et al.*, 2016). Los brotes causados por *C. cayetanensis* y *E. histolytica* son mucho menos frecuentemente identificados (Chen *et al.*, 2001; Baldursson y Karanis, 2011; Guzman-Herrador *et al.*, 2015). El mayor brote de criptosporidiosis asociado a consumo de agua identificado hasta la fecha ocurrió en Milwaukee (Wisconsin, EEUU) en 1997, afectando a más de 400.000 personas y causando 4.400 hospitalizaciones, más de 100 muertes y un impacto económico de más de 96\$ millones (MacKenzie *et al.*, 1994; Corso *et al.*, 2003). El mayor brote hídrico de giardiosis tuvo lugar en Bergen (Noruega), viéndose afectadas más de 2.500 personas (Nygård *et al.*, 2006).

La contaminación de aguas superficiales con materia fecal conteniendo (oo)quistes y esporas de estos patógenos puede ser el resultado, individual o colectivo, de varios procesos incluyendo el arrastre por aguas de escorrentía tras eventos de lluvia intensa o deshielo, manejo inadecuado del ganado y de sus excrementos, deficiencias en el funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales o efluentes incontrolados y no tratados de estas últimas. La contribución relativa de cada uno de estos factores dependerá de las características particulares de cada cuenca hídrica (Carmena, 2010).

En España la ocurrencia de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales se ha investigado principalmente en Aragón (Ramo *et al.*, 2017), Cataluña (Gracenea *et al.*, 2018), Galicia (Castro-Hermida *et al.*, 2008, 2009, 2015), Madrid (Galván *et al.*, 2014) y País Vasco (Carmena *et al.*, 2007). Las muestras analizadas procedían de ríos, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de agua potable y residual y de piscinas. Ambos parásitos han sido detectados en concentraciones de 0–4 (oo)quistes/L en aguas de red para consumo humano (Carmena *et al.*, 2007; Castro-Hermida *et al.*, 2008, 2015; Ramo *et al.*, 2017), y de 13 ooquistes/L en aguas de piscina (Gracenea *et al.*, 2018). Más del 90% de los (oo)quistes detectados eran viables (Castro-Hermida *et al.*, 2015) y pertenecían a especies/genotipos potencialmente infectivos para el hombre incluyendo *C. hominis*, *C. parvum*, y *C. ubiquitum* dentro del género *Cryptosporidium* y al *assemblage* A dentro de *G. duodenalis* (Köster y Carmena, 2020). Se han descrito brotes de enfermedad gastrointestinal por criptosporidiosis asociados al consumo de agua o al uso de aguas recreativas en Madrid (Rodríguez-Salinas Pérez *et al.*, 2000) y Navarra (Fuentes *et al.*, 2015). Los microsporidios *E. bienewisi*, *E. cuniculi* y *E. intestinalis* han sido identificados en muestras de agua procedentes de cuencas hidrográficas y plantas de tratamiento de agua tanto potable como residual (Izquierdo *et al.*, 2011; Galván *et al.*, 2013). *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* sp. han sido detectados por técnicas de metagenómica en aguas superficiales utilizadas para regadío (Moreno *et al.*, 2018) y, más recientemente, *E. histolytica* y *E. moshkovskii* (junto con *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.) en plantas de tratamiento de aguas residuales en el norte de España (Benito *et al.*, 2020).

### 1.4.2. Transmisión animal-persona. Zoonosis

Muchas especies de protistas enteroparásitos infectivos para el hombre lo son también para una gran diversidad de animales incluyendo animales de producción, animales de compañía y animales en cautividad y salvajes. Estos reservorios tienen por lo tanto el potencial de actuar como fuentes de infección humana por protozoos (Appelbee *et al.*, 2005; Feng y Xiao, 2011; Ryan y Cacciò, 2013), estramenópilos (Parkar *et al.*, 2010) y microsporidios (Mathis *et al.*, 2005; Santín y Fayer, 2011; Li *et al.*, 2019a). Si bien la transmisión zoonótica de estas especies está incuestionablemente aceptada por la comunidad científica, más dudas existen sobre la dimensión y frecuencia con la que este tipo de eventos ocurren realmente (O'Handley, 2007; de Lucio *et al.*, 2017; Rehbein *et al.*, 2019). Casi todos los estudios epidemiológicos publicados en especies animales estiman el potencial zoonótico del enteroparásito investigado en base a si éste ha sido previamente descrito en humanos o no. Este dato, por sí solo, no debe ser usado para inferir transmisión zoonótica debido a i) la ausencia, en muchos casos, de datos moleculares fiables a nivel de genotipo/subgenotipo; ii) la ausencia, en la inmensa mayoría de

casos, de una población humana control, y iii) la posibilidad, cada vez más evidente, de que muchas de las infecciones detectadas en animales sean de hecho de origen humano. Estas afirmaciones son particularmente válidas para especies animales en estrecho contacto con el hombre, como perros y gatos domésticos (Ballweber *et al.*, 2010; Esch y Petersen, 2013). Por lo tanto, la demostración de transmisión zoonótica implica la presencia de un patógeno de la misma especie y genotipo/subgenotipo simultáneamente en poblaciones humanas y animales que comparten el mismo espacio físico y temporal. Bajo esta premisa, muy pocos estudios epidemiológicos realizados en animales domésticos (Inpankaew *et al.*, 2007; Volotão *et al.*, 2007) y en cautividad (Parkar *et al.*, 2010) han demostrado la ocurrencia de tales eventos, siendo muchos más lo que no han conseguido probarlos (Cooper *et al.*, 2010; de Lucio *et al.*, 2017; Rehbein *et al.*, 2019).

La mayoría de las especies animales infectadas con protistas entéricos lo están por genotipos/subgenotipos especialmente adaptados a ellas y que no infectan (o lo hacen muy raramente) al hombre. Sin embargo, otras variantes genéticas de estos patógenos son mucho más laxas en cuanto a sus requerimientos de hospedador. La evidencia más clara es la de *C. parvum*, una especie zoonótica de *Cryptosporidium* que infecta al hombre y a una gran variedad de mamíferos, predominantemente ungulados domésticos (Ryan *et al.*, 2014). Los casos de criptosporidiosis humana por *C. parvum* son más prevalentes en áreas rurales con importante actividad ganadera de Irlanda, Holanda y EEUU (Zintl *et al.*, 2009; Wielinga *et al.*, 2008; Feltus *et al.*, 2006), alcanzando un pico estacional en primavera que ha sido asociado a transmisión zoonótica durante la temporada de partos del ganado vacuno y ovino (Chalmers *et al.*, 2009). Los animales de producción y de vida libre también pueden actuar como importantes fuentes de contaminación de cuencas hidrográficas usadas para abastecer de agua potable a redes de distribución urbanas (Zahedi *et al.*, 2015).

En España, las poblaciones de perros y gatos domésticos analizadas en profundidad mediante técnicas moleculares no parecen actuar como reservorios adecuados de infecciones humanas por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. (de Lucio *et al.*, 2017; Gil *et al.*, 2017; Adell-Aledón *et al.*, 2018), o *Blastocystis* sp. (Paulos *et al.*, 2018). Actualmente se desconoce el papel de los animales como fuente de infección de microsporidiosis humana en España, aunque sabemos que tanto los carnívoros domésticos como salvajes pueden ser portadores de genotipos de *E. bienersi* potencialmente infectivos para el hombre (Santín *et al.*, 2018; Dashti *et al.*, 2019). Por el contrario, el hallazgo de ooquistes de *C. hominis* (una especie de *Cryptosporidium* inicialmente considerada como específica de humanos) en un perro doméstico en Álava (Gil *et al.*, 2017), un tejón salvaje en Asturias (Mateo *et al.*, 2017) y cuatro

zorros salvajes en Galicia ([Barrera et al., 2020](#)) demuestran claramente el origen antropozoonótico de algunas de las infecciones por *Cryptosporidium* en estos (y muy probablemente otros) hospedadores animales no humanos. Esta evidencia epidemiológica y molecular ha contribuido a replantear recientemente la noción de especificidad de hospedador de *C. hominis* ([Widmer et al., 2020](#)). Finalmente, se demostró en aguas superficiales destinadas al consumo humano de Álava que las aves acuáticas podían ser una fuente de contaminación por quistes de *G. duodenalis* potencialmente infecciosos para el hombre ([Cano et al., 2016](#)).

### 1.4.3. Transmisión persona-persona

La transmisión persona-persona es una ruta importante para la dispersión de protistas entéricos, estando siempre asociada a hábitos higiénicos personales deficientes, infraestructuras de saneamiento subóptimas y condiciones de hacinamiento. Por estas razones, las infecciones tanto sintomáticas como asintomáticas causadas por estos patógenos son más frecuentemente reportadas en guarderías ([Enserink et al., 2014](#)), centros de acogida y cuidado de ancianos ([White et al., 1989](#)), centros hospitalarios ([Koch et al., 1985](#)) y en población reclusa ([Angal et al., 2015](#)), entre otros. La giardiosis y la criptosporidiosis son especialmente prevalentes en niños menores de tres años, por lo que el cambio de pañales en guarderías es un factor de riesgo para el personal que los atiende ([Hoque et al., 2001](#)). Estas enfermedades, además de la amebiosis, pueden también transmitirse por vía sexual anal u oral (contacto orofecal), por lo que algunos colectivos homosexuales son más propensos a padecerlas ([Hellard et al., 2003](#); [Escobedo et al., 2014](#); [Fernández-Huerta et al., 2019](#)). Además, existe evidencia demostrando que la criptosporidiosis puede transmitirse a partir de secreciones respiratorias vía inhalación de partículas aerosolizadas o por contacto con fómites (cuerpos inermes) contaminadas por ellas ([Sponseller et al., 2014](#)).

En España existen varios trabajos epidemiológicos moleculares demostrando que la transmisión persona-persona es causa no solo de brotes de enfermedad sintomática en guarderías ([Goñi et al., 2015](#)), sino también de infecciones subclínicas en niños en edad preescolar ([Mateo et al., 2014](#)). Por otra parte, *E. histolytica* fue el protista entérico más comúnmente identificado (20,5%) en población homosexual en Barcelona ([Fernández-Huerta et al., 2019](#)). La situación epidemiológica de las principales enfermedades causadas por protistas entéricos en España se describe con más detalle en la sección [1.11](#).

#### 1.4.4. Transmisión alimentaria

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que los alimentos contaminados son una vía de transmisión de protistas entéricos (además de helmintos) mucho más relevante de lo inicialmente estimado (Ryan *et al.*, 2018, 2019; Almeria *et al.*, 2019). Es previsible que esta tendencia se vea intensificada en los próximos años como consecuencia directa del impacto que la globalización y el cambio climático está ejerciendo en los ecosistemas y los patrones de transmisión de estos patógenos (Pozio, 2020). La falta de técnicas de detección estandarizadas y de protocolos de vigilancia epidemiológica específicamente adaptados a estos productos representan una seria limitación para conocer el alcance real de la vía alimentaria en la transmisión de patógenos intestinales (Trevisan *et al.*, 2019).

En base a criterios como impacto en salud pública, repercusión económica en comunidades vulnerables o relevancia comercial, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han indicado que la criptosporidiosis, la amebiosis y la giardiosis ocupan los puestos quinto, sexto y onceavo en la lista de parásitos de transmisión alimentaria más relevantes (Devleesschauwer *et al.*, 2017). Solo en el caso de *Cryptosporidium* spp. se estima que hay 8,6 millones de casos de infección por este protozoo asociados a transmisión alimentaria en el mundo, causando 3.759 muertes y 296.156 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) en 2010 (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Los (oo)quistes y esporas de protistas entéricos han sido hallados en una gran diversidad de alimentos incluyendo verduras frescas, ensaladas envasadas, frutos, leche no pasteurizada de vaca y de oveja, productos lácteos, salsas de origen vegetal, condimentos e incluso carne cruda o poco cocinada (Ryan *et al.*, 2018, 2019; Almeria *et al.*, 2019). También se han encontrado (oo)quistes y esporas en moluscos bivalvos filtradores de agua como ostras, almejas y mejillones (Palos Ladeiro *et al.*, 2013). Frutos (particularmente fresas, arándanos y afines) y vegetales son contaminados mediante irrigación con aguas no tratadas que contienen restos fecales de origen humano o animal, o por la aplicación de estiércol como fertilizante. La contaminación antroponómica también es posible durante el cosechado, envasado, distribución y preparación de estos alimentos cuando los trabajadores agrícolas y los manipuladores de alimentos no cumplen con la normativa de buenas prácticas e higiene personal (Colli *et al.*, 2014; Figgatt *et al.*, 2017). Por lo general, los brotes alimentarios descritos tienden a afectar a un número más limitado de personas que los de origen hídrico (Pönka *et al.*, 2009; Blackburn *et al.*, 2006).

En España, los estudios dirigidos a determinar la frecuencia de protistas entéricos en alimentos son escasos. Se ha detectado la presencia de quistes de *G. duodenalis* y ooquistes de *Cryptosporidium* en verduras irrigadas con aguas contaminadas en Valencia (Amorós *et al.*, 2010) y en moluscos bivalvos marinos en Galicia (Gomez-Bautista *et al.*, 2000; Gómez-Couso *et al.*, 2004) y de agua dulce/salobre en Zaragoza (Mosteo *et al.*, 2016). Estudios experimentales murinos han demostrado la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en almejas artificialmente inoculadas con este patógeno (Freire-Santos *et al.*, 2001).

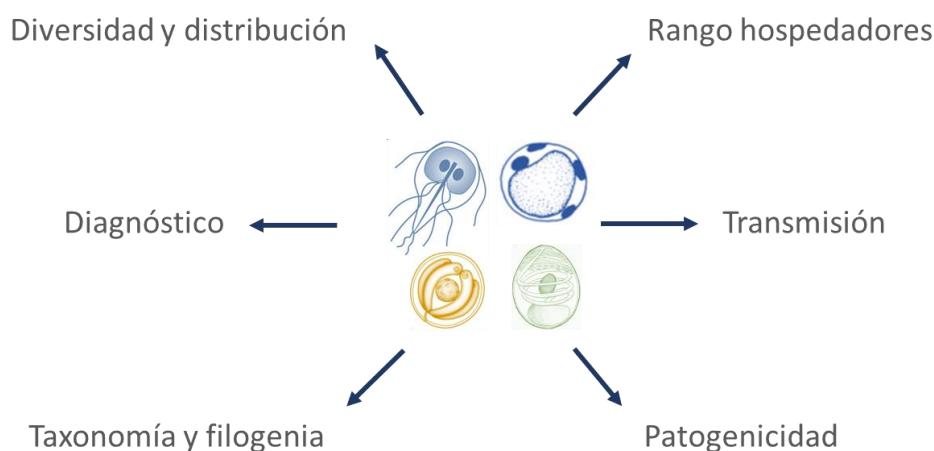
### 1.5. Diagnóstico molecular. Aplicaciones y relevancia epidemiológica

Los ensayos moleculares basados en la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están inexorable e irreversiblemente reemplazando a los métodos tradicionales (principalmente microscopía) en el diagnóstico de primera línea de protistas entéricos causantes de trastornos gastrointestinales (McHardy *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2017). Esta tendencia, iniciada en laboratorios de referencia e investigación, se va extendiendo progresivamente a los laboratorios microbiológicos de centros clínicos y asistenciales, sobre todo en países de renta alta (van Lieshout y Roestenberg, 2015). Aunque con mucha más dificultad y retraso debido a importantes limitaciones económicas y de carencia de personal cualificado, es esperable (y muy deseable) que esta tecnología también se vaya implantando de forma paulatina en países de renta media y baja (Meurs *et al.*, 2017). Una de las grandes ventajas que ofrece la PCR en su formato en tiempo real múltiple (qPCR) es la posibilidad de detectar simultáneamente patógenos de origen vírico, bacteriano y parasitario que causan síntomas clínicos parecidos (diagnóstico sindrómico) a partir de la misma muestra (Momčilović *et al.*, 2019; Dacal *et al.*, 2020). En el caso de protistas enteroparásitos, esta metodología permite:

- i) Detectar cantidades ínfimas de ADN parasitario y mejorar ostensiblemente la sensibilidad diagnóstica de los métodos convencionales (Llewellyn *et al.*, 2016).
- ii) Identificar patógenos (*Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *D. fragilis*, microsporidios) de forma eficiente sin recurrir a procedimientos y/o tinciones específicos (Taniuchi *et al.*, 2011).
- iii) Diferenciar especies patógenas y apatógenas, como *E. histolytica* y *E. dispar* (Tanyukselel y Petri, 2003).
- iv) Mejorar los flujos de trabajo de forma coste-efectiva, reducir el tiempo de respuesta y de inicio de tratamiento y minimizar la generación de resultados falsos positivos (Goldenberg *et al.*, 2015).

A pesar de estas ventajas, las técnicas moleculares también presentan limitaciones que deben ser siempre tenidas en cuenta. Las más obvias son la imposibilidad de determinar la viabilidad/infectividad de una muestra positiva, y la dificultad para diferenciar infecciones sintomáticas y asintomáticas de eventos de transporte mecánico sin infección (Binnicker, 2015).

El conocimiento de la epidemiología y dinámica de transmisión de los protistas enteropatógenos requiere un conocimiento profundo de su estructura genética poblacional y evolutiva. Las técnicas de PCR asociadas a secuenciación Sanger y, más recientemente, de secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*) proporcionan una poderosa herramienta para generar este tipo de información, permitiendo determinar con precisión la frecuencia y diversidad molecular a nivel de secuencia nucleotídica de un patógeno concreto (Lymbery y Thompson, 2012). Estas aproximaciones posibilitan múltiples aplicaciones (Figura 1) incluyendo el uso de marcadores genéticos optimizados para la detección o la caracterización molecular del patógeno de interés (Monis *et al.*, 2005), la determinación de distancias evolutivas en análisis filogenéticos (Morrison, 2005) y de taxonomía (Monis *et al.*, 2009; Cacciò y Sprong, 2010), la estimación de frecuencias alélicas en estudios de genética poblacional (Cooper *et al.*, 2007; Das y Ganguly, 2014), la emergencia de nuevos genotipos virulentos (Fan *et al.*, 2019), el estudio de mecanismos de reproducción asexual, sexual y de recombinación genética (Andersson, 2012; Li *et al.*, 2013), la descripción de nuevos ciclos de transmisión (Li *et al.*, 2019a), el estudio de brotes de enfermedad (Xiao y Feng, 2017), la vigilancia epidemiológica activa (Merino *et al.*, 2019), el estudio de resistencias a los tratamientos farmacológicos habituales (Müller *et al.*, 2008) o su asociación con la microbiota intestinal del hospedador (Stensvold y van der Giezen, 2018; Tito *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Aplicaciones de las técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación para el estudio de la biología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento de protistas entéricos de relevancia en salud pública.

### 1.6. *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* (sinónimo *G. intestinalis*, *G. lamblia*) es un parásito eucariota intestinal que infecta el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos, produciendo la enfermedad denominada giardiosis. El descubrimiento del parásito es atribuido a Antonie van Leeuwenhoek a finales del siglo XVI, quien durante sus investigaciones microscópicas lo halló en su propia materia fecal diarreica (Dobell, 1920). Ya en el siglo XVIII Lamblen identificó este organismo como *Cercomonas intestinalis* (Elmendorf *et al.*, 2003). En el siglo XIX, Kunstler sugirió el nombre de *Giardia* en honor a su tutor A.M. Giard en París, cuando lo encontró en renacuajos. Posteriormente, a principios del siglo XX, Stiles lo denominó *Giardia lamblia* en homenaje al profesor Lambl, que redescubrió la especie y proporcionó su primera descripción completa (Rajurkar *et al.*, 2012).

*Giardia duodenalis* es reconocido como el protozoo intestinal más común en el tracto digestivo humano, causando infecciones sintomáticas a 250–300 millones de personas anualmente, principalmente en países de renta baja (Pires *et al.*, 2015). Las manifestaciones clínicas de la giardiosis varían desde ausencia de sintomatología a diarrea crónica (Einarson *et al.*, 2016). La malabsorción de nutrientes es una de las consecuencias más graves de la enfermedad, causando anemia, diarrea y retraso en el desarrollo de las funciones cognitivas de los niños infectados (Halliez y Buret, 2013). Aunque en menor medida que en países de baja renta, estos efectos también son perceptibles en poblaciones pediátricas en países desarrollados incluido España (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). La giardiosis representa un serio problema de salud pública en países de alta endemicidad y causa un considerable impacto socioeconómico debido a la alta prevalencia y morbilidad de la infección. Por estas razones la giardiosis fue incorporada oficialmente en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas de la OMS en 2004 (Savioli *et al.*, 2006).

#### 1.6.1. Taxonomía y diversidad genética

La taxonomía del género *Giardia* sigue siendo controvertida debido a la amplia gama de hospedadores susceptibles de ser infectados y a la limitación de las características morfológicas confiables para definir especies independientes. Estos problemas han sido parcialmente resueltos con la llegada de las herramientas moleculares basadas en PCR y secuenciación (Sulaiman *et al.*, 2004).

De acuerdo con la sistemática propuesta por Cavalier-Smith (2003) y Ruggiero *et al.* (2015) basada en la combinación de datos genéticos, estructurales y bioquímicos, el encuadre taxonómico actual del género *Giardia* se describe a continuación:

Reino – Protozoa

Subreino – Eozoa

Infrareino – Excavata

Filo – Metamonada

Clase – Eopharyngea

Orden – Diplomonadida

Familia – Hexamitidae

Género – *Giardia*

Actualmente, el género *Giardia* comprende seis especies, siendo *G. duodenalis* la única infectiva para el hombre, aunque también se encuentra en muchos otros mamíferos, incluidos animales de producción y de compañía (Ryan y Cacciò, 2013; Feng y Xiao, 2011) (Tabla 2). Filice realizó en 1952 un intento preliminar de racionalizar la complejidad taxonómica intrínseca de *Giardia*, proponiendo la asignación de especies descritas previamente en tres grupos distintos: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis* (Filice, 1952). Estudios posteriores de microscopía ultraestructural ampliaron el género con la descripción de tres nuevas especies que infectan a aves (*G. ardeae* y *G. psittaci*) y roedores (*G. microti*). Más tarde, todas las especies se han redefinido en base a la secuenciación de los genes tanto del ARN ribosómico como de beta giardina, triosa fosfato isomerasa, y glutamato deshidrogenasa, entre otros.

**Tabla 2.** Especies actualmente reconocidas en el género *Giardia* y variabilidad genética observada dentro de *G. duodenalis* incluyendo el nombre de especie propuesto para cada genotipo o *assemblage*. Adaptado de Feng y Xiao, 2011.

Especie	Hospedador principal	Reportado en humanos
<i>Giardia agilis</i>	Anfibios	No
<i>Giardia ardeae</i>	Aves	No
<i>Giardia psittaci</i>	Aves	No
<i>Giardia microti</i>	Roedores	No
<i>Giardia muris</i>	Roedores	No
<i>Giardia duodenalis</i>	Humanos y otros mamíferos	Sí
Assemblage A (= <i>G. duodenalis</i> <sup>a</sup> )	Humanos y otros mamíferos	Sí
Assemblage B (= <i>G. entérica</i> <sup>a</sup> )	Humanos y otros mamíferos	Sí
Assemblage C (= <i>G. canis</i> <sup>a</sup> )	Perros y cánidos salvajes	Sí
Assemblage D (= <i>G. canis</i> <sup>a</sup> )	Perros y cánidos salvajes	Sí
Assemblage E (= <i>G. bovis</i> <sup>a</sup> )	Ungulados domésticos y salvajes	Sí
Assemblage F (= <i>G. cati</i> <sup>a</sup> )	Gatos y félidos salvajes	Sí
Assemblage G (= <i>G. simondi</i> <sup>a</sup> )	Ratones y ratas	No
Assemblage H	Pinnípedos marinos	No

<sup>a</sup> Nombre de especie propuesto.

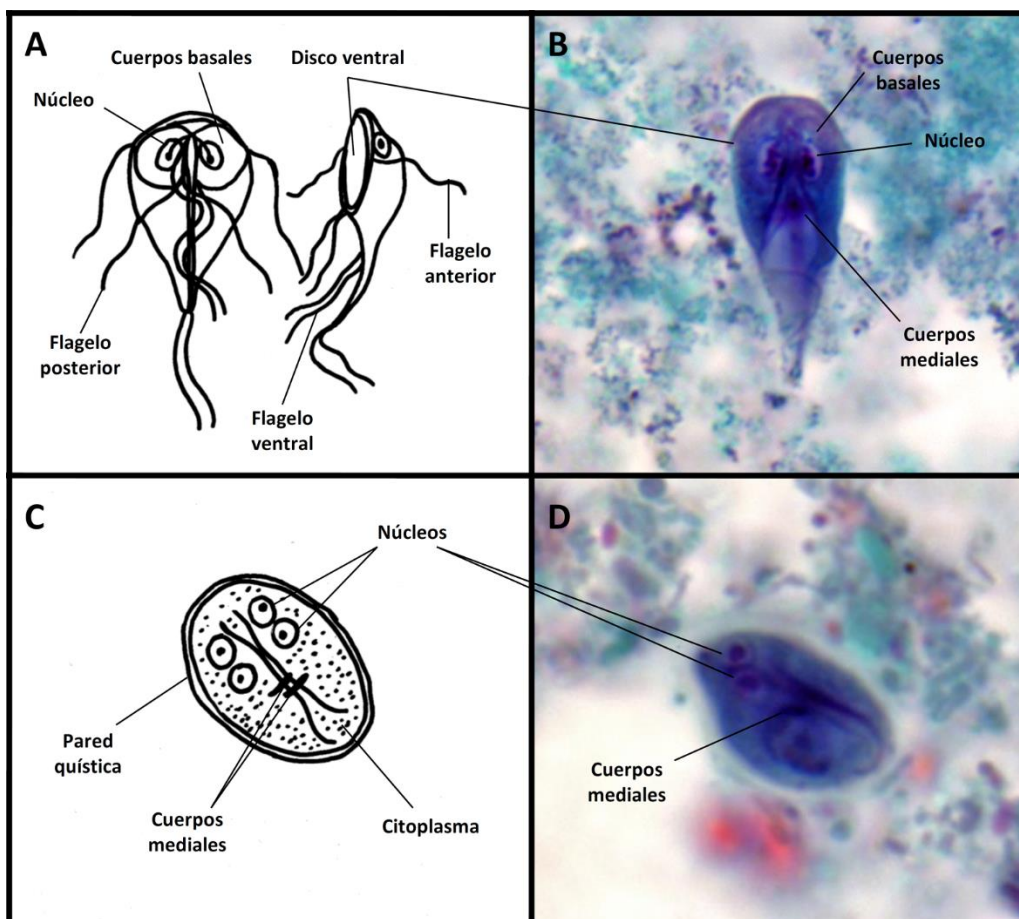
*Giardia duodenalis* es actualmente considerada como un complejo que agrupa ocho genotipos (*assemblages*, A-H) con acusadas diferencias en rango/especificidad de hospedadores, virulencia y distribución geográfica. Las distancias genéticas que separan estos genotipos son considerables, y estudios recientes a nivel del genoma completo indican que al menos los *assemblages* A, B y E representan en realidad especies distintas (Franzén *et al.*, 2009; Thompson y Monis, 2011). Muy probablemente estas variantes genéticas adquieran el estatus de especie independiente en un futuro cercano (Tabla 2). Los genotipos A y B son los más frecuentemente hallados en el hombre, aunque ambas variantes también infectan otras especies animales incluyendo animales de producción y de compañía y tienen por lo tanto potencial zoonótico (Ryan y Cacciò, 2013). De forma ocasional, los genotipos C-F han sido reportados causando infecciones oportunistas en humanos, sobre todo en niños e individuos inmunocomprometidos (Foronda *et al.*, 2008; Traub *et al.*, 2009).

Estudios moleculares basados en el análisis de secuencias multilocus han demostrado una elevada variabilidad genética intragenotípica. Así, los *assemblages* A y B estarían subdivididos en cuatro (AI-AIV y BI-BIV) sub-*assemblages* cada uno (Monis *et al.*, 2003). Los sub-*assemblages* AI y AII se distribuyen en humanos y otros mamíferos, mientras que AIII y AIV se encuentran circulando en especies animales no humanas. Los sub-*assemblages* BIII y BIV son especialmente prevalentes en humanos, mientras que BI y BII se hallan predominantemente en otras especies animales (Feng y Xiao, 2011). Los *assemblages* C-H presentan una menor diversidad en sus secuencias nucleotídicas y no se subdividen en sub-*assemblages*. En España el *assemblage* B es más frecuentemente encontrado en humanos que el *assemblage* A (de Lucio *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). Esta proporción se mantiene al comparar datos de países de rentas altas y bajas, pero en estos últimos la frecuencia de infecciones mixtas es mayor (Ryan y Cacciò, 2013; Einarsson *et al.*, 2016). Algunos estudios han propuesto que el *assemblage* A se asocia más a la diarrea intermitente y el *assemblage* B, a la diarrea persistente (Homan y Mank, 2001), mientras que los individuos con *assemblage* A parecen más propensos a ser sintomáticos (Haque *et al.*, 2005). Sin embargo, actualmente no hay una relación clara entre el genotipo de *G. duodenalis* y la presencia e intensidad de los signos clínicos.

### 1.6.2. Morfología

*Giardia duodenalis* presenta dos estadios de desarrollo: el trofozoíto, que es la forma vegetativa, y el quiste, que es la forma infecciosa. El trofozoíto (14–20 µm de largo por 7–10 µm de ancho) es entre piriforme y ovalado con simetría bilateral; posee una superficie dorsal convexa y un gran disco adhesivo ventral; está constituido por dos núcleos y posee cuatro

pares de flagelos que le aportan movilidad (Figura 2). Los trofozoítos se desarrollan en las criptas glandulares y submucosa del duodeno y yeyuno proximal. En respuesta a la estimulación por colesterol y sales biliares los trofozoítos inician el proceso de enquistamiento para formar quistes, la forma de transmisión del parásito, que son inmediatamente infecciosos en el momento de la excreción (Huang y White, 2006). Los quistes de *G. duodenalis* son de forma ovalada (8–12  $\mu\text{m}$  de largo por 7–10  $\mu\text{m}$  de ancho) con una delgada pared hialina. Los quistes inmaduros son binucleados, pero los maduros presentan cuatro núcleos y otras estructuras internas denominadas cuerpos medianos curvos y axonemas longitudinales (Figura 2). Los quistes de *G. duodenalis* pueden mantener su infectividad en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, aunque son sensibles a la desecación. Además, son resilientes a las condiciones de acidez estomacales y al tratamiento con cloro en las concentraciones y tiempos de exposición comúnmente utilizados en los tratamientos del agua de consumo (Carmena, 2010).



**Figura 2.** Estructura de los estadios de desarrollo de *Giardia duodenalis*. (A) Dibujo esquemático de un trofozoíto. (B) Tinción tricrómica de un trofozoíto de *G. duodenalis* observado a 1000x. (C) Dibujo esquemático de un quiste. (D) Tinción tricrómica de un quiste de *G. duodenalis* observado a 1000x. Fuente: Calero-Bernal y Carmena (2018).

La multiplicación de *G. duodenalis* es considerada exclusivamente asexual. No se han hallado células diferenciadas (gametos) ni mecanismos de reproducción sexual que impliquen recombinación genética. Sin embargo, estudios epidemiológicos (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2009) y de genética poblacional (Cooper *et al.*, 2007) han cuestionado esta noción y demostrado que, al menos ocasionalmente, el intercambio de material genético es posible a través de procesos de fusión nuclear (cariogamia) o transferencia de plásmidos episomales (Poxleitner *et al.*, 2008). Estos fenómenos son más frecuentes en áreas endémicas donde la frecuencia de transmisión del parásito es alta.

### 1.6.3. Clínica y patogénesis

En los casos sintomáticos la infección por *G. duodenalis* puede cursar con un amplio rango de signos clínicos siendo los más frecuentes diarrea aguda o crónica, deshidratación, molestias abdominales y pérdida de peso. En los niños el riesgo de desnutrición es alto porque la diarrea y la consiguiente malabsorción de nutrientes son causa de anemia (deficiencia de vitamina B12 y ferritina) y retraso en el desarrollo psicomotor y cognitivo debido a la deficiencia de proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas liposolubles (Berkman *et al.*, 2002; Carvalho-Costa *et al.*, 2007).

Los mecanismos subyacentes a la patogénesis de *G. duodenalis* siguen sin conocerse completamente. Varios procesos fisiopatológicos se han asociado con la infección, incluidos la disrupción de las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal y la inducción de procesos de apoptosis (Koh *et al.*, 2013), el cambio en la permeabilidad de los enterocitos como resultado del efecto citopatológico de metabolitos (proteasas, toxinas) del parásito (Vivancos *et al.*, 2018) o la inducción de disbiosis en la microbiota intestinal del hospedador (Beatty *et al.*, 2017). Como consecuencia de estos procesos patogénicos las microvellosidades del borde en cepillo del epitelio intestinal se acortan resultando en deficiencias en disacaridasas y otras enzimas (Cotton *et al.*, 2011), así como en cambios en la permeabilidad y la absorción intestinal (Buret, 2007).

### 1.6.4. Diagnóstico laboratorial

Tradicionalmente, el diagnóstico de la infección por *G. duodenalis* se basa en el examen de muestras de heces mediante microscopía para la identificación de quistes y, en casos de muestras diarreicas, también trofozoítos. Sin embargo, la variabilidad en los patrones de excreción de formas parasitarias hace que la sensibilidad de esta técnica sea dependiente del número de muestras fecales examinadas, así como del uso o no de métodos de concentración (Cama y Mathison, 2015). Aunque la microscopía es laboriosa y requiere personal capacitado,

se considera una técnica económica y relativamente rápida que además permite la detección de otros parásitos en la misma muestra (El-Nahas *et al.*, 2013).

Además de la microscopía se han validado también diferentes métodos para el diagnóstico de la giardiosis basados en análisis inmunológicos y moleculares (García *et al.*, 2017). De éstas, y debido a su mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica, las técnicas basadas en PCR son las más prometedoras. Además, el análisis de secuencias de los productos de amplificación obtenidos permite determinar la especie y genotipo/subgenotipo de *G. duodenalis* implicada en la infección. Recientemente se han desarrollado protocolos de qPCR de alto rendimiento en formato múltiple que permiten la detección simultánea de varias especies de parásitos y otros patógenos entéricos de forma rápida y eficiente, siendo herramientas de gran utilidad en laboratorios clínicos (Shin *et al.*, 2018; Dacal *et al.*, 2020). Los métodos moleculares son extremadamente sensibles a la calidad del ADN de partida, por lo que la elección del método de extracción y purificación de ADN es un elemento clave para maximizar las opciones de éxito en estas reacciones (Paulos *et al.*, 2016).

#### 1.6.5. Tratamiento y prevención

Existe un número notable de fármacos efectivos para el tratamiento de la giardiosis humana, siendo el de elección el metronidazol (Vivancos *et al.*, 2018). Otras opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección incluyen otros nitroimidazoles como el tinidazol, el ornidazol y el secnidazol (Gardner y Hill, 2001). La mayoría de estos fármacos responden a un curso único de tratamiento, especialmente cuando se administra metronidazol o quinacrina. En pacientes refractarios al tratamiento habitual (bien por resistencia, recaída o baja adhesión al tratamiento prescrito) puede ser necesaria la administración en varios cursos de distintos fármacos, bien de forma única o combinada. En ocasiones estos tratamientos generan problemas de toxicidad, efectos secundarios no deseados y alteraciones de la microbiota intestinal normal.

El metronidazol se absorbe rápida y completamente después de la administración oral y penetra en tejidos corporales, evidenciándose en fluidos biológicos como saliva, leche materna, semen y secreciones vaginales. El fármaco se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta en la orina (Lau *et al.*, 1992). Se estima que ~20% de los casos de giardiosis humana son refractarios a los tratamientos farmacológicos habituales con metronidazol y tinidazol (Lalle, 2010). Muchos de estos casos de viajeros procedentes de países del sureste asiático (Nabarro *et al.*, 2015).

Dado que los quistes de *G. duodenalis* son fácilmente transmitidos a través de agua contaminada, las medidas de control más eficientes contra este parásito son las dirigidas a garantizar la calidad del agua de consumo mediante la eliminación física (filtración, floculación, sedimentación) o inactivación (p.e. radiación UV) de sus formas de resistencia. En países de renta baja o media éste es un problema grave para las instituciones y autoridades responsables de garantizar el suministro de agua potable, ya que las regiones más afectadas por la enfermedad son siempre aquéllas con acceso limitado al agua potable y al saneamiento (Hotez *et al.* 2015). La transmisión persona-persona y animal-persona es prevenible mediante la adopción de hábitos higiénicos apropiados como el lavado de manos. El tratamiento de personas asintomáticas que excretan quistes está indicado para prevenir la autoinfección y la propagación de la infección a personas sanas.

### **1.7. *Cryptosporidium* spp.**

*Cryptosporidium* es un género de parásitos apicomplejos patógenos intracelulares obligados que infectan una amplia gama de vertebrados, incluido el hombre. Históricamente fue Ernest Edward Tyzzer quien en 1907 describió la especie tipo (*C. muris*) en glándulas gástricas de ratones (Tyzzer, 1907). Posteriormente los estadios infectivos del parásito fueron identificados en el intestino del mismo hospedador, denominándose esta especie *C. parvum* (Tyzzer, 1912). *Cryptosporidium* spp. es reconocido por primera vez como patógeno humano en 1976, tras ser identificado en un niño inmunocompetente y en un adulto inmunosuprimido con diarrea (Nime *et al.*, 1976; Meisel *et al.*, 1976).

La criptosporidiosis representa un serio problema de salud pública global. Los resultados de grandes estudios epidemiológicos de campo como el *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) y el *Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development Project* (MAL-ED) han revelado que la criptosporidiosis afecta a más de 7 millones de niños y causa más de 200.000 muertes en niños menores de 2 años en países de África subsahariana y el sudeste asiático. Como en el caso de la giardiosis, la criptosporidiosis también está asociada a retraso en el desarrollo psicomotor y cognitivo de los niños afectados (Kotloff *et al.*, 2013; Korpe *et al.*, 2018). En países de renta alta las infecciones por *Cryptosporidium* spp. causan un número significativo de ingresos hospitalarios en niños, ancianos, individuos inmunocomprometidos y viajeros provenientes de áreas endémicas (Fletcher *et al.*, 2012; Duplessis *et al.*, 2017).

### 1.7.1. Taxonomía y diversidad genética

Los intentos iniciales para diferenciar especies dentro del género *Cryptosporidium* estaban basados casi exclusivamente en rasgos morfológicos distintivos y diferencias aparentes en el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados. Sin embargo, los ooquistes de diferentes especies de *Cryptosporidium* son de pequeño tamaño y muy parecidos entre ellos, por los que la asignación a una especie concreta debe basarse en criterios moleculares (Fall *et al.*, 2003). Por esta razón la mayoría de los ooquistes encontrados en humanos y especies animales hasta el final de la década de 1990 fueron identificados y publicados como *C. parvum*, *C. parvum*-like o simplemente *Cryptosporidium*, asumiéndose que las infecciones humanas eran de origen animal (Fayer, 2010). Sin embargo, la demostración de que el parásito también podía transmitirse por contacto directo persona-persona sugirió la existencia de dos genotipos independientes de *Cryptosporidium*: el "genotipo humano", transmitido persona-persona, y el "genotipo bovino", transmitido de animales (principalmente bovinos domésticos) al hombre (Casemore y Jackson, 1984). El genotipo humano fue finalmente designado como *C. hominis* en 2002 (Morgan-Ryan *et al.*, 2002), mientras que el "genotipo bovino" continuó denominándose *C. parvum*.

En base a características biológicas (ausencia de mitocondrias y apicoplasto) y moleculares (carencia de la mayoría de los genes nucleares) el género *Cryptosporidium* es el único miembro de la subclase Cryptogregaría (Cavalier-Smith, 2014; Ruggiero *et al.*, 2015), siendo su encuadre taxonómico el siguiente:

Reino – Chromista

Subreino – Harosa (Supergrupo SAR)

Superfilo – Alveolata (Filo Miozoa)

Subfilo – Myzozoa (Infrafilo Apicomplexa)

Superclase – Sporozoa (Clase Gregarinomorpha)

Orden – Cryptogregarida

Familia – Cryptosporidiidae

Género – *Cryptosporidium*

Al menos 46 especies de *Cryptosporidium* son actualmente consideradas como taxonómicamente válidas, de las que 18 pueden causar infecciones en humanos (Tabla 3). De ellas *C. hominis* y *C. parvum* son responsables de más del 90% de los casos reportados globalmente (Xiao, 2010; Ryan *et al.*, 2014). Otras especies menos frecuentes causantes de criptosporidiosis humana son *C. meleagridis*, *C. ubiquitum* y *C. viatorum*.

**Tabla 3.** Taxonomía actual del género *Cryptosporidium*.

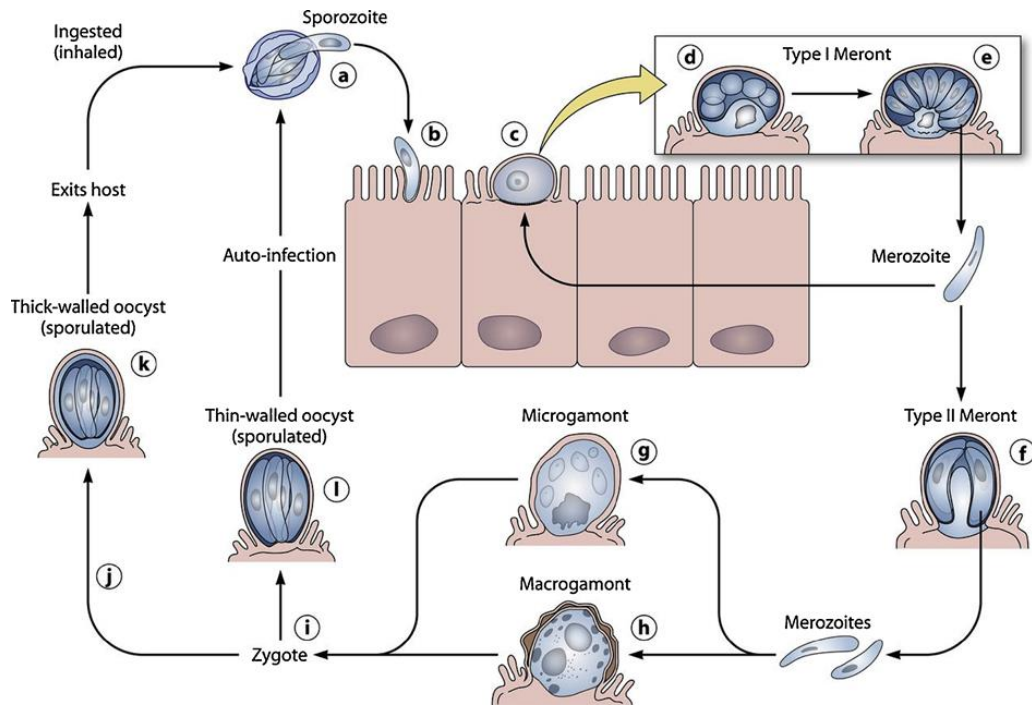
Especies	Hospedador(es) principal(es)	Reportado en humanos
<i>C. alticolis</i>	Roedores	No
<i>C. andersoni</i>	Cabras	Esporádicamente
<i>C. apodemi</i>	Roedores	No
<i>C. avium</i>	Aves	No
<i>C. baileyi</i>	Aves	No
<i>C. bollandi</i>	Peces	No
<i>C. bovis</i>	Cabra	Esporádicamente
<i>C. canis</i>	Perros, cánidos salvajes	Esporádicamente
<i>C. cichlidis</i>	Peces	No
<i>C. cuniculus</i>	Conejos	Moderadamente
<i>C. ditrichi</i>	Roedores	No
<i>C. ducismarci</i>	Tortugas	No
<i>C. erinacei</i>	Erizos, caballos	Esporádicamente
<i>C. fayeri</i>	Marsupiales	Esporádicamente
<i>C. felis</i>	Gatos	Esporádicamente
<i>C. fragile</i>	Anfibios	No
<i>C. galli</i>	Aves	No
<i>C. homai</i>	Roedores	No
<i>C. hominis</i>	Humanos, primates no humanos	Muy comúnmente
<i>C. huwi</i>	Peces	No
<i>C. macropodum</i>	Marsupiales	No
<i>C. meleagridis</i>	Aves y humanos	Moderadamente
<i>C. microti</i>	Roedores	No
<i>C. molnari</i>	Peces	No
<i>C. muris</i>	Roedores, aves	Esporádicamente
<i>C. occultus</i>	Roedores	No
<i>C. ornithophilus</i>	Aves	No
<i>C. parvum</i>	Rumiantes y humanos	Comúnmente
<i>C. pestis</i>	Rumiantes y humanos	Muy comúnmente
<i>C. proliferans</i>	Roedores	No
<i>C. proventriculi</i>	Aves	No
<i>C. ratti</i>	Ratas	No
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peces	No
<i>C. rubeyi</i>	Roedores	No
<i>C. ryanae</i>	Cabra, ungulados salvajes	No
<i>C. scophthalmi</i>	Peces	No
<i>C. scrofarum</i>	Cerdos, jabalís	Esporádicamente
<i>C. serpentis</i>	Reptiles	No
<i>C. suis</i>	Cerdos	Esporádicamente
<i>C. testudinis</i>	Tortugas, cocodrilos	No
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores	Esporádicamente
<i>C. ubiquitum</i>	Rumiantes, roedores, primates	Comúnmente
<i>C. varanii</i>	Reptiles	No
<i>C. viatorum</i>	Humanos, roedores	Moderadamente
<i>C. wrairi</i>	Roedores	No
<i>C. xiaoi</i>	Ovejas, cabras	Esporádicamente

Desde su primera descripción en 2000, el gen codificante de la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*) es el marcador genético más utilizado para el genotipado de *C. parvum* y *C. hominis*. La elevada variabilidad en la secuencia de este locus permite categorizar *C. parvum* y *C. hominis* en múltiples familias de subtipos en base a diferencias en el número de repeticiones de trinucleóticos (TCA, TCG o TCT) presentes a continuación del extremo 3' de la secuencia del péptido señal del gen (Strong *et al.*, 2000). Posteriormente se han ido desarrollando protocolos específicos basados en *gp60* para el genotipado de otras especies de *Cryptosporidium* incluyendo *C. fayeri* (Power *et al.*, 2009), *C. meleagridis* (Stensvold *et al.*, 2014), *C. ubiquitum* (Li *et al.*, 2014), *C. viatorum* (Stensvold *et al.*, 2015), *C. felis* (Rojas-Lopez *et al.*, 2020) y *C. ryanae* (Yang *et al.*, 2020).

Los subtipos basados en secuencias *gp60* se nombran designando la especie con un numeral romano (I: *C. hominis*, II: *C. parvum*, III: *C. meleagridis*, etc.) y la familia con una letra (a, b, c, etc.). A continuación, se indica el número de repeticiones TCA (representado por la letra A), TCG (representado por la letra G) o TCT (representado por la letra T). Por ejemplo, el genotipo IaA11G3T3 indicaría que el parásito pertenecería a la familia 'e' de *C. hominis* y tendría 11 copias del tri-nucleótico TCA, tres copias de TCG y tres copias de TCT en su secuencia (Sulaiman *et al.*, 2005; Xiao, 2010). De forma adicional, otras secuencias repetitivas presentes en algunas familias de subtipos (AAGACGGTGGTAAGG o sus variaciones en Ia, AAGAAGGCAAAGAAG o sus variaciones en If y ACATCA en IIa) se designan con la letra R al final del subtipo, como el caso de *C. parvum* IIaA15G2R1 (Ryan *et al.*, 2014). Así, se han descrito 10 familias (Ia-Ik) de subtipos en *C. hominis* y 19 familias (IIa-IIt) de subtipos en *C. parvum*, de las cuales IIa y IId son zoonóticas (Anexo I). En humanos son frecuentes las familias de subtipos Ia, Ib, Id, Ie, If y Ig en *C. hominis*, y IIa, IIc y IIe en *C. parvum* (Xiao y Feng, 2017).

### 1.7.2. Morfología

El estadio infeccioso de *Cryptosporidium* es el ooquiste, de forma esférica o ligeramente ovoide y un diámetro de 4–6 µm. Posee una gruesa pared trilaminar continua excepto en uno de los polos, que es un punto de sutura sensible a la acción de la tripsina y otras proteasas. La capa más externa es rica en glicoproteínas, la central contiene sobre todo glicolípidos y la más interna está compuesta principalmente por glicoproteínas organizadas en filamentos de apariencia lineal que proporcionan un grado de elasticidad a la pared del ooquiste. Por su parte, la estructura interna está formada por 4 esporozoitos vermiformes y cuerpos residuales que no son claramente visibles durante el examen microscópico (Fayer y Ungar, 1986). Debido a la complejidad de su ciclo de vida, *Cryptosporidium* posee diversos estadios de desarrollo intracelulares que se resumen en la Figura 3.



**Figura 3.** Representación esquemática del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Tras la rotura del ooquiste desencadenada por la acción de proteasas y aminopeptidasas en el estómago y el duodeno (a), los esporozoítos liberados en el lumen intestinal penetran en las microvellosidades intestinales (b) y forman vacuolas parasitóforas (c). En esta estructura, intracelular pero extracitoplasmática, el parásito se transforma en trofozoítos para reproducirse asexualmente y formar merontes tipo I (d y e). Los merontes tipo I infectan células adyacentes del epitelio intestinal y vuelven a reproducirse asexualmente para generar nuevos merontes tipo I pero también merontes tipo II (f). Los merontes tipo II inician un ciclo de reproducción sexual transformándose en microgametos (g) y macrogametos (h). Los cigotos formados como consecuencia de la fusión de micro- y macrogametos (i) entran en una fase de esporogonia (j) para generar ooquistes de pared gruesa (k) o delgada (l). Los ooquistes de pared gruesa contienen 4 esporozoítos y son expulsados con las heces del hospedador, mientras que los ooquistes de pared delgada son autoinfectivos y contribuyen a mantener la infección durante periodos prolongados. Fuente: Khan *et al.* (2018).

### 1.7.3. Clínica y patogénesis

Las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis son patentes tras un período de incubación de 2 a 14 días y varían desde leves trastornos gastrointestinales, episodios espontáneos de diarrea hasta diarrea crónica y deshidratación severa asociada a una disminución de la superficie de absorción (Bouzid *et al.*, 2013). En personas inmunocompetentes la infección suele ser autolimitada resolviéndose en 2–3 semanas. Los efectos más graves se observan en niños en estado de desnutrición, individuos inmunocomprometidos y pacientes receptores de trasplantes de órgano sólido, en los que la infección puede ser mortal. Además, la malabsorción puede estar presente en infecciones graves y contribuir al síndrome de desgaste

que se observa en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Certad *et al.*, 2017). Las infecciones subclínicas (asintomáticas) son también comunes (Davies *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2014).

*Cryptosporidium* tiende a infectar el intestino delgado distal y el colon proximal, pero puede hallarse en toda la longitud del tracto entérico y biliar e incluso en las vías respiratorias. La criptosporidiosis persistente está asociada con atrofia de las microvellosidades intestinales y un ligero aumento en los linfocitos de la lámina propia. En casos más graves hay hiperplasia de las criptas del epitelio intestinal e infiltración marcada con linfocitos, células plasmáticas e incluso neutrófilos (Huang y White, 2006). En cuanto a los mecanismos de acción, *Cryptosporidium* spp. promueve procesos de disfunción de las uniones estrechas de las células epiteliales del intestino y altera su permeabilidad (Hemphill *et al.*, 2019; Bouzid *et al.*, 2013). Estas modificaciones están mediadas por diferentes moléculas incluyendo proteasas, fosfolipasas y hemolisinas (Certad *et al.*, 2017). El parásito es capaz, además, de modular y evadir el sistema inmune del hospedador y de limitar fenómenos de apoptosis (Di Genova y Tonelli, 2016; Laurent y Lacroix-Lamandé, 2017).

#### 1.7.4. Diagnóstico laboratorial

Al igual que en el caso de *G. duodenalis*, el examen microscópico sigue siendo la técnica de referencia para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces, sobre todo en países de baja y media renta (Khurana y Chaudhary, 2018). Los métodos de tinción ácido-rápida, con o sin concentración de heces, se usan en los laboratorios clínicos de forma rutinaria. Los procedimientos más frecuentes incluyen tinciones con carbol-fucsina, Kinyoun, safranina-azul de metileno y sobre todo la tinción ácido-rápida modificada Ziehl-Neelsen (Jex *et al.*, 2008). Comparativamente, la microscopía de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos ofrece unas prestaciones diagnósticas superiores a la microscopía convencional, seguida de cerca por ensayos inmunoenzimáticos para la detección de antígenos del parásito en heces (García *et al.*, 2018; Dacal *et al.*, 2020). Los métodos moleculares basados en PCR, inicialmente solo disponibles en centros de referencia e investigación, están siendo implementados cada vez con más frecuencia en los algoritmos diagnósticos de los laboratorios clínicos de centros hospitalarios, sobre todo en sus formatos múltiples para la detección simultánea de varios patógenos entéricos (van Lieshout y Roestenberg, 2015). Entre los comercialmente disponibles destacan el BD MAX<sup>TM</sup> Enteric Parasite Panel (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EEUU), el Luminex xTAG<sup>®</sup> Gastrointestinal Pathogen Panel y el Verigene Enteric Pathogens Test (Luminex, Austin, EEUU), el NanoCHIP<sup>®</sup> GIP (Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Israel), el Biofire FilmArray<sup>TM</sup> Gastrointestinal Panel (BioFire

Diagnostics, Salt Lake City, EEUU), el EasyScreen™ Enteric Parasite Detection Kit (Genetic Signatures, Sydney, Australia), el G-DiaPara™ (Diagenode Diagnostics, Antwerp, Bélgica), the RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania), el Allplex™ Gastrointestinal Parasite Panel 4 (Seegene Inc, Seúl, Corea del Sur), y el FTD® Stool Parasites (Fast Track, Luxemburgo). Estos kits ofrecen una elevada sensibilidad (53–100%) y especificidad (99–100%) diagnóstica (Autier *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2017; Paulos *et al.*, 2019).

### 1.7.5. Tratamiento y prevención

La nitazoxanida es el único medicamento aprobado actualmente disponible para el tratamiento de la infección por *Cryptosporidium* spp. en niños mayores de un año; sin embargo, este fármaco no es efectivo en pacientes con VIH/SIDA, incluso en tratamientos prolongados con dosis altas. La paromomicina, la azitromicina, la rifamicina y los inhibidores de la proteasa del VIH han sido probados sin éxito para la criptosporidiosis en pacientes con SIDA (Checkley *et al.*, 2015).

Dado que *Cryptosporidium* spp. comparte con *G. duodenalis* varias fuentes de infección y vías de transmisión, las medidas de prevención son esencialmente las mismas que las señaladas anteriormente para este último patógeno: eliminación o inactivación efectiva de los ooquistes en aguas de consumo humano (incluidas las recreativas) e incentivación de las prácticas de higiene personal (p.e. lavado de manos) principalmente en poblaciones de riesgo como niños y personas inmunodebilitadas. En este sentido, y debido a su alto potencial zoonótico, las infecciones por *C. parvum* son relativamente frecuentes en personas en contacto directo con animales de producción o sus excrementos.

### 1.8. *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es una especie parasitaria unicelular que infecta preferentemente el tracto digestivo del hombre y una amplia variedad de especies animales incluyendo primates no humanos, animales domésticos y reptiles (Cui *et al.*, 2019). Es el agente etiológico de la amebiosis incluyendo colitis (o disentería) amebiana y absceso hepático y pulmonar. Históricamente, la amebiosis intestinal fue descrita en detalle por Fedor Lösch en 1875 en San Petersburgo (Rusia). En 1903 el zoólogo alemán Fritz Schaudinn diferenció la especie comensal apatógena *Entamoeba coli* de la patógena, a la que denominó *E. histolytica* por su capacidad lesiva en tejidos infectados. Durante décadas se pensó erróneamente que *E. histolytica* infectaba al 10% de la población mundial (Pritt y Clark, 2008). Sin embargo, estudios posteriores evidenciaron que la mayoría de estas infecciones debían ser atribuidas en realidad a otras especies de amebas morfológicamente idénticas, pero no patógenas. Así, Emile Brumpt

propuso en 1925 la existencia de dos especies de *Entamoeba* indiferenciables, una patógena (*E. histolytica*) y otra no patógena a la que denominó *E. dispar* (Brumpt, 1925). Posteriormente, en 1978 se demostró que *E. histolytica* y *E. dispar* diferían en sus perfiles de isoenzimas (Sargeant *et al.*, 1978). Sin embargo, no fue hasta 1993 que ambas especies fueron formalmente reconocidas en base a los estudios bioquímicos, inmunológicos y moleculares disponibles en ese momento (Diamond y Clark, 1993). El descubrimiento de una tercera especie morfológicamente indistinguible y no patógena en 1941, denominada *E. moshkovskii*, ha complicado todavía más la epidemiología de *E. histolytica* (Tshalaia, 1941). Sin embargo, la avirulencia de *E. dispar* y *E. moshkovskii* ha sido cuestionada en estudios experimentales y epidemiológicos posteriores (Beck *et al.*, 2008; Dolabella *et al.*, 2012). En 2012 en el estudio de una cohorte de niños en Mirpur (Bangladesh) se identificó una nueva especie, *E. bangladeshi*, también morfológicamente idéntica a *E. histolytica* y de patogenicidad todavía incierta (Royer *et al.*, 2012).

La infección por *Entamoeba histolytica* es una de las principales causas de diarrea en regiones tropicales, siendo el quinto patógeno en carga de enfermedad global estimada en AVAD (Organización Mundial de la Salud, 2016). Se estima que la amebiosis afecta a 50 millones de personas en el mundo anualmente, causando la muerte de hasta 100.000 de ellas (Walsh, 1986). En áreas endémicas las infecciones asintomáticas recurrentes son comunes como consecuencia de las altas tasas de infección y reinfección (Blessmann *et al.*, 2003). Así, el estudio GEMS determinó que *E. histolítica* era una de las 15 principales causas de diarrea moderada a severa en niños menores de 5 años en África subsahariana y el sudeste asiático, estando asociada a una mayor mortalidad en el segundo año de vida (Kotloff *et al.*, 2013; Levine *et al.*, 2020). En países de renta alta la amebiosis se reporta en viajeros e inmigrantes provenientes de áreas endémicas, así como en individuos inmunocomprometidos, principalmente pacientes VIH (Ali *et al.*, 2008) y en el grupo de riesgo de hombres que practican sexo con hombres (Shirley *et al.*, 2019). Como en el caso de la giardiosis y la criptosporidiosis, los niños son especialmente vulnerables a la amebiosis, particularmente aquéllos que viven en áreas desfavorecidas con pobres condiciones higiénico-sanitarias. En poblaciones pediátricas la amebiosis está asociada a desnutrición, retraso del crecimiento y déficit cognitivo (Mondal *et al.*, 2006).

#### 1.8.1. Taxonomía y diversidad genética

Tradicionalmente, la descripción de nuevas especies dentro del género *Entamoeba* ha sido basada en diferencias morfológicas en los estadios de desarrollo del parásito (quistes y trofozoítos) y en el rango y especificidad de los hospedadores susceptibles de ser infectados o

colonizados (Ruggiero *et al.*, 2015). En base a estas consideraciones y a datos bioquímicos y moleculares, el encuadre taxonómico actual del género *Entamoeba* es el siguiente:

Reino – Protozoa  
 Subreino – Sarcomastigota  
 Filo – Amoebozoa  
 Subfilo – Conosa  
 Clase – Archamoeba  
 Orden – Mastigamoebida  
 Familia – Entamoebidae  
 Género – *Entamoeba*

En las últimas dos décadas el desarrollo de métodos moleculares basados en la amplificación y secuenciación del ADN parasitario ha mejorado significativamente nuestra comprensión de la diversidad del género *Entamoeba* y su epidemiología (Jacob *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2019). Nuevas especies han sido descritas en diferentes hospedadores y áreas geográficas (Tachibana *et al.*, 2007; Ngobeni *et al.*, 2017) (Tabla 4).

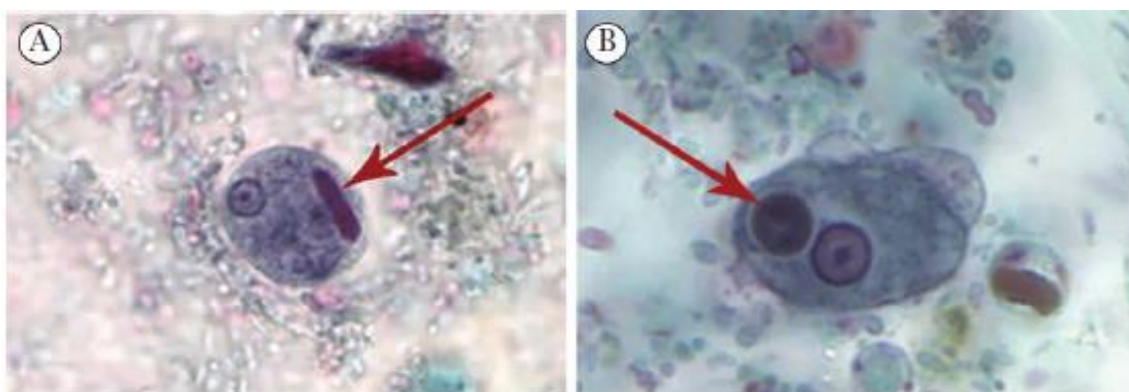
**Tabla 4.** Taxonomía actual del género *Entamoeba*. Se indican las especies más relevantes descritas en vertebrados.

Especies	Hospedador (es) principal(es)	Reportado en humanos
<i>Entamoeba histolytica</i>	Humanos, primates no humanos	Muy comúnmente
<i>Entamoeba dispar</i>	Humanos, primates no humanos	Muy comúnmente
<i>Entamoeba moshkovskii</i>	Humanos, otros mamíferos	Moderadamente
<i>Entamoeba coli</i>	Humanos, primates no humanos	Moderadamente
<i>Entamoeba hartmanni</i>	Humanos, primates no humanos	Esporádicamente
<i>Entamoeba polecki</i>	Humanos, primates no humanos	Esporádicamente
<i>Entamoeba bangladeshi</i>	Humanos	Esporádicamente
<i>Entamoeba nuttalli</i>	Humanos, primates no humanos	Esporádicamente
<i>Entamoeba gingivalis</i>	Humanos	Moderadamente
<i>Entamoeba chattoni</i>	Primates no humanos	No
<i>Entamoeba bovis</i>	Vacas, ovejas	No
<i>Entamoeba equi</i>	Caballos	No
<i>Entamoeba suis</i>	Cerdos	No
<i>Entamoeba muris</i>	Roedores	No
<i>Entamoeba invadens</i>	Reptiles	No
<i>Entamoeba terrapinae</i>	Reptiles	No
<i>Entamoeba insolita</i>	Reptiles	No
<i>Entamoeba barreti</i>	Reptiles	No
<i>Entamoeba estudines</i>	Reptiles	No
<i>Entamoeba ranarum</i>	Reptiles	No

De ellas, al menos ocho especies son capaces de infectar o colonizar el intestino humano, incluyendo *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. bangladeshi* y *E. nuttalli*. *Entamoeba gingivalis*, que coloniza/infecta la cavidad oral, es la única especie amebiana humana de localización estrictamente extraintestinal.

### 1.8.2. Morfología

La forma vegetativa del parásito presente en el colon humano es el trofozoíto, que es anaerobio facultativo, con forma irregular ameboide alargada y un tamaño que oscila entre 10–60  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el citoplasma tiene un único núcleo con un cariosoma central, cromatina periférica fina distribuida regularmente y vacuolas que pueden contener eritrocitos fagocitados del huésped (Figura 4). A partir del citoplasma se forman prolongaciones o pseudópodos con los que se desplaza. El trofozoíto se multiplica por fisión binaria y, según transita por el intestino grueso, se transforma en un estadio intermedio denominado prequiste, de morfología esférica, inmóvil, sin diferenciación de ectoplasma y endoplasma, con pared gruesa y un solo núcleo (Chávez-Munguía *et al.*, 2008). El quiste es la forma infecciosa y de resistencia del patógeno que es liberado al medio ambiente con las heces del hospedador. En condiciones de temperatura (10–34 °C) y humedad adecuadas los quistes pueden permanecer viables entre 7–30 días (Chávez-Munguía *et al.*, 2008). Su forma es esférica u oval, con una pared resistente de quitina y un diámetro de 10–15  $\mu\text{m}$ . En el citoplasma tienen cuerpos cromatoides en forma de barra con bordes curvos y, cuando son inmaduros, una vacuola con glucógeno (Figura 4). Se dividen por mitosis sucesivas por lo que al alcanzar la madurez presentan cuatro núcleos.



**Figura 4.** Estructura de los estadios de desarrollo de *Entamoeba histolytica*. (A) Tinción tricrómica de un quiste de *E. histolytica*. La flecha roja indica el característico cuerpo cromatoide con extremos romos. (B) Tinción tricrómica de un trofozoíto de *E. histolytica*. La flecha roja indica un eritrocito fagocitado. Fuente: Shirley *et al.* (2018).

### 1.8.3. Clínica y patogénesis

La mayoría (~90%) de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas (Gathiram y Jackson, 1987; Blessmann *et al.*, 2003). En estos casos el parásito se desarrolla en el colon del hospedador alimentándose de bacterias y alimentos semidigeridos sin causar daño aparente (amebiosis luminal), sugiriendo que la invasión tisular asociada a la amebiosis es más la excepción que la norma. Las razones que obedecen a este hecho son poco conocidas, pero estudios recientes han demostrado que la bacteria anaerobia estricta *Prevotella copri* está sobrerrepresentada en la microbiota intestinal de personas con colitis amebiana, sugiriendo que los procesos de disbiosis pueden contribuir, al menos parcialmente, al desarrollo de la enfermedad (Stanley, 2003; Ngobeni *et al.*, 2017).

En el caso de producirse, la invasión intestinal está caracterizada típicamente por la presencia de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta como consecuencia de la capacidad del trofozoíto amebiano para invadir y lisar el epitelio intestinal (principalmente el de la región derecha del colon) del hospedador infectado (Fotedar *et al.*, 2007). Otros síntomas clínicos incluyen episodios de diarrea acuosa o con presencia de moco, estreñimiento y tenesmo. Los casos más severos de colitis amebiana se caracterizan por abundante diarrea sanguinolenta, dolor abdominal difuso y, en ocasiones, fiebre. La enterocolitis necrotizante fulminante, la forma más severa de la enfermedad, es a menudo fatal (Petri, 2002; Gardiner *et al.*, 2015).

En ocasiones, los trofozoítos de *E. histolytica* pueden alcanzar el hígado desde el intestino por la vena portal y formar abscesos amebianos. El lóbulo hepático derecho es siempre el más afectado. Aproximadamente el 50–80% de los casos con absceso hepático presentan síntomas dentro de 2–4 semanas, incluyendo fiebre, hemoptisis y dolor en la región infraescapular (Wuerz *et al.*, 2012). Otras localizaciones extraintestinales menos frecuentes son los pulmones, el cerebro y el tracto genitourinario. La rotura de un absceso hepático en la cavidad pleural puede originar abscesos pulmonares y fístulas bronco-hepáticas con pus. La presencia de bilis en estas secreciones es indicativa de su origen hepático (Shamsuzzaman y Hashiguchi, 2002).

Los trofozoítos de *E. histolytica* ejercen sus efectos patogénicos a través de su notable capacidad de destrucción tisular que implica la secreción de proteasas, fosfolipasas y una proteína formadora de poros denominadas amebaporo (Christy y Petri, 2011). El proceso de invasión comienza con la proteólisis de la mucina MUC2 (el principal componente glucoproteico de la mucosa intestinal), previo contacto directo entre lectinas del parásito y las glucoproteínas presentes en la mucina del colon (Petri *et al.*, 2002). Antes de la adhesión celular, los trofozoítos secretan inmunomoduladores que estimulan las células epiteliales, lo

que resulta en producción de citoquinas y posterior infiltración de células inflamatorias de la mucosa (Moonah *et al.*, 2013). La adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales se realiza gracias a la acción citolítica de proteasas y amebaporos causantes de úlceras de diversos tamaños que generalmente terminan en la perforación de la luz de la pared intestinal. La muerte de la célula hospedadora puede alcanzarse a través de varios mecanismos incluyendo la inducción de muerte celular programada (apoptosis), fagocitosis y trogocitosis (Petri *et al.*, 2002; Ralston *et al.*, 2014).

#### 1.8.4. Diagnóstico laboratorial

Para el diagnóstico de la amebiosis existe un amplio abanico de métodos parasitológicos, inmunológicos y moleculares (Tanyuksel y Petri, 2003; Fotedar *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2017). Las técnicas microscópicas incluyen preparaciones en fresco, concentración y frotis teñidos permanentemente para la identificación de quistes y trofozoítos en heces. Debido a su bajo coste y sencillez, el examen microscópico es la técnica de diagnóstico de primera línea en muchos laboratorios clínicos, sobre todo en países de baja y media renta. Sin embargo, la limitada sensibilidad (~60%) de este método junto a su incapacidad para diferenciar *E. histolytica* de otras amebas apatógenas (p.e. *E. dispar* y *E. moshkovskii*) pero morfológicamente idénticas hacen recomendable el uso de otras técnicas más sensibles y específicas. La presencia de eritrocitos del hospedador en el trofozoíto es una característica patognomónica de *E. histolytica*.

Los inmunoensayos para la detección de antígenos del parásito en heces han contribuido a mejorar las limitaciones diagnósticas de la microscopía convencional. Estos métodos son fáciles de usar, tienen un tiempo de respuesta relativamente rápido y existen kits disponibles comercialmente como el Techlab *E. histolytica* II (Blacksburg, VA, EEUU) y el Cellabs CELISA Path (Brookvale, Australia). Sin embargo, también adolecen de algunos problemas como sensibilidad y especificidad variables (particularmente en áreas no endémicas) y no son adecuados para la detección de abscesos hepáticos amebianos (Ryan *et al.*, 2017). Igualmente están disponibles comercialmente diversas pruebas de diagnóstico rápido basadas en inmunocromatografía como el Triage Parasite Panel (Biosite Diagnostic Inc., San Diego, CA, EEUU), el ImmunoCard STAT!® CGE (Meridian Bioscience Inc., Luckenwalde, Alemania), el RIDA®QUICK *Entamoeba* Test (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania) y el Quik Chek (TechLab, Blacksburg, VA, EEUU). Finalmente existen diferentes pruebas serológicas para detectar la seroconversión causada por *Entamoeba* spp., como la inmunotransferencia, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA) y el ensayo

por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El principal inconveniente de estos métodos es que no diferencian entre infección activa y resuelta (Shirley *et al.*, 2018).

Al igual que en el caso de otros protistas enteroparásitos, las técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación se han convertido en el método de referencia para la detección y el diagnóstico diferencial de *E. histolytica*. Distintas variantes de PCR están disponibles hasta la fecha, incluyendo PCR directa, PCR anidada, qPCR y qPCR múltiple (Qvarnstrom *et al.*, 2005). Estas herramientas han contribuido enormemente al desarrollo de la taxonomía y la epidemiología de las especies de *Entamoeba* (Stensvold *et al.*, 2011b). Aunque cada vez más implementada en laboratorios clínicos y de investigación, el elevado coste de esta tecnología y la necesidad de personal experimentado puede limitar su uso en entornos con recursos limitados (Saidin *et al.*, 2019).

El diagnóstico histopatológico mediante biopsia endoscópica o resección quirúrgica puede mostrar la úlcera característica en forma de matraz causada por la invasión de *E. histolytica* en el epitelio intestinal. Los trofozoítos del parásito pueden identificarse en el borde de la úlcera o embebidos en el tejido usando tinción de ácido peryódico de Schiff o el marcaje con inmunoperoxidasa de anticuerpos específicos anti-*E. histolytica*. Para la detección de abscesos hepáticos amebianos también son de utilidad las técnicas de imagen como la ultrasonografía, la tomografía axial computerizada abdominal y la resonancia magnética (Shirley *et al.*, 2018).

### 1.8.5. Tratamiento y prevención

Todos los pacientes con amebiosis, incluyendo los portadores asintomáticos, deben ser tratados farmacológicamente. Los pacientes con enfermedad clínica requieren tratamiento con 2 fármacos: un agente amebicida activo en tejido y un agente cisticida luminal. Las personas con amebiosis asintomática solo necesitan ser tratadas con un agente cisticida (e.g. paromomicina) para prevenir la invasión tisular y la transmisión (Blessmann *et al.*, 2003).

Entre los agentes amebicidas se incluyen los antibióticos antiparasitarios metronidazol y tinidazol, ambos derivados del nitroimidazol. Son los fármacos de elección en la terapia para la colitis amebiana y los abscesos hepáticos amebianos por su eficacia en la eliminación de los trofozoítos invasores (Gonzales *et al.*, 2019). El tinidazol tiene una vida media más larga y se tolera mejor, mientras que el metronidazol, igual de efectivo, puede presentar efectos adversos en algunos pacientes. En pacientes con problemas de malabsorción o intolerancia a metronidazol por vía oral se debe administrar este fármaco por vía intravenosa (Kimura *et al.*, 2007).

El fracaso terapéutico y los efectos adversos (náuseas, dolor de cabeza, anorexia, sabor metálico, neuropatía periférica) debidos a la toxicidad asociada al tratamiento con metronidazol en algunos pacientes y la posibilidad de resistencia clínica manifiesta de *E. histolytica* al fármaco hacen que sea imperativo la búsqueda de tratamientos alternativos, como la nitazoxanida (Rossignol *et al.*, 2007). En algunos casos el tratamiento con nitroimidazoles no erradica completamente los quistes luminales, por lo que se recomienda su administración conjunta con paromomicina o el fármaco de segunda línea furoato de diloxanida (Gonzales *et al.*, 2019).

El enfoque de los esfuerzos preventivos primarios debe estar dirigido a la seguridad de los alimentos y el agua, así como a la atención de la higiene personal y a evitar la exposición fecal-oral, incluso a través de prácticas sexuales. Se estima que el lavado de manos (particularmente después de ir al baño, cambiar pañales y antes de manipular o preparar alimentos) con agua y jabón podría reducir la mortalidad asociada a enfermedades diarreicas hasta en un 50%. Sin embargo, mantener estas prácticas puede ser difícil en muchas áreas del mundo debido a la falta de recursos básicos como agua potable y jabón. *Entamoeba histolytica* no es una especie zoonótica, por lo que el contacto con animales no supone un riesgo de infección.

### 1.9. *Blastocystis* sp.

*Blastocystis* sp. es un protista entérico cosmopolita y estrictamente anaerobio que habita el tracto gastrointestinal del hombre y de una gran diversidad de animales domésticos, en cautividad y salvajes (Alfellani *et al.*, 2013a, 2013b). Este organismo fue identificado por primera vez por Alexieff en 1911, quién propuso su naturaleza fúngica (Alexieff, 1911). Un año después, Brumpt lo describió como una levadura inocua a la que denominó *Blastocystis hominis* (Brumpt, 1912), siendo esta nomenclatura mantenida durante casi 100 años. En 1967 *B. hominis* fue reclasificado como protozooario dentro del reino Protista (Zierdt *et al.*, 1967). Posteriormente, en base a análisis filogenéticos a partir de su ARN ribosómico, *B. hominis* fue encuadrado en el superfilo Heterokonta, un grupo de organismos diverso que incluye las algas marrones y las diatomeas (Silberman *et al.*, 1996). Estudios moleculares posteriores confirmaron que *Blastocystis* posee una gran diversidad genética y es capaz de infectar/colonizar a un amplio rango de animales, además del hombre. Como consecuencia, la terminología de *Blastocystis* fue normalizada en 2007. A partir de esa fecha, todos los aislados descritos en mamíferos y aves pasaron a denominarse *Blastocystis* sp. y fueron inicialmente distribuidos en 9 subtipos (Stensvold *et al.*, 2007).

*Blastocystis* sp. es el protista entérico más comúnmente identificado en muestras de heces humanas. Se estima que más de 1.000 millones de personas están infectadas/colonizadas por este microorganismo en todo el mundo (Scanlan y Stensvold, 2013). Debido a su transmisión fecal-oral, *Blastocystis* sp. es más prevalente en comunidades con acceso limitado a agua potable y condiciones higiénico sanitarias deficientes. En estas poblaciones hasta el 100% de los individuos analizados pueden ser portadores del parásito (El Safadi *et al.*, 2014). *Blastocystis* sp. es también un hallazgo frecuente en poblaciones aparentemente sanas (asintomáticas) de países con renta alta incluida España (Engsbro *et al.*, 2014; Scanlan *et al.*, 2014; Paulos *et al.*, 2018).

La relevancia clínica de *Blastocystis* sp. es objeto de intenso debate en la comunidad científica. Inicialmente considerado como un organismo comensal, estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos posteriores han sugerido su relación causal con enfermedad intestinal y extraintestinal. Sin embargo, los mecanismos por los cuales *Blastocystis* sp. podría causar daño en el hospedador, así como los posibles factores de virulencia y de riesgo de infección involucrados, son todavía desconocidos en gran medida (Scanlan, 2012).

### 1.9.1. Taxonomía y diversidad genética

Aunque la inclusión de *Blastocystis* sp. en el superfilo Heterokonta está plenamente justificada desde el punto de vista molecular (Arisue *et al.*, 2002), existen discrepancias morfológicas significativas entre *Blastocystis* sp. y otros miembros de este grupo taxonómico. Por ejemplo, los estramenópilos tienen flagelos recubiertos de fibrillas a modo de peine denominadas mastigonemas, característica ésta ausente en *Blastocystis* sp. Por este motivo se ha sugerido que *Blastocystis* debe ser incluido en un nuevo reino denominado Chromista (Cavalier-Smith, 1998; Ruggiero *et al.*, 2015). *Blastocystis* sp. es el único estramenopilo capaz de infectar/colonizar el tracto digestivo humano. Su encuadre taxonómico actual se describe a continuación:

Reino – Chromista

Subreino – Harosa (Supergrupo SAR)

Infrareino – Halvaria

Superfilo – Heterokonta (Supergrupo Stramenopiles)

Filo – Bigyra

Clase – Blastocystea (Orden Blastocystida)

Familia – Blastocystidae

Género – *Blastocystis*

En el momento de la normalización de su nomenclatura en 2007, *Blastocystis* sp. estaba constituido por 9 subtipos (ST1-ST9) (Stensvold *et al.*, 2007). A partir de ese año, nuevos STs fueron sucesivamente identificados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Subtipos actualmente reconocidos en *Blastocystis* sp.

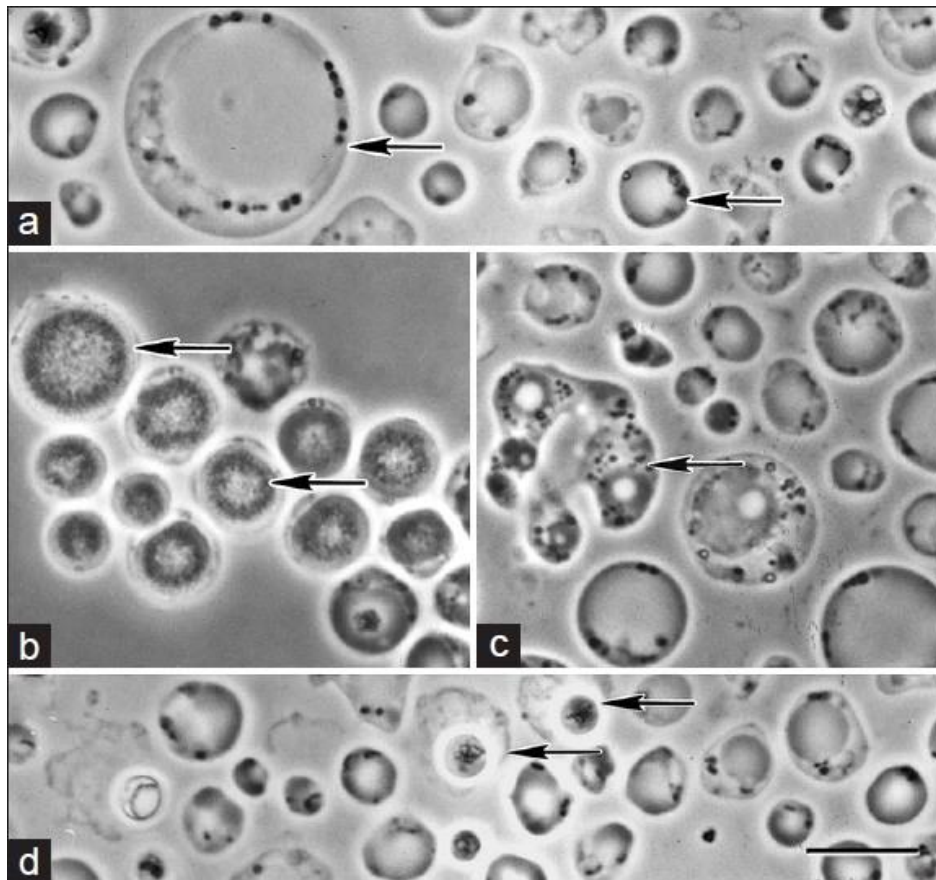
Subtipo	Hospedador(es) principal(es)	Reportado en humanos
ST1	Humanos, primates no humanos, perros, vacas, cerdos, aves	Muy comúnmente
ST2	Humanos, primates no humanos, perros, vacas, cerdos, roedores, aves	Comúnmente
ST3	Humanos, primates no humanos, vacas, cerdos, roedores	Muy comúnmente
ST4	Humanos, roedores, primates no humanos, ungulados, aves	Comúnmente
ST5	Humanos, primates no humanos, vacas, cerdos, aves	Esporádicamente
ST6	Humanos, aves	Esporádicamente
ST7	Humanos, aves, codorniz, cabra, vaca	Esporádicamente
ST8	Humanos, marsupiales, ave, primates no humanos	Esporádicamente
ST9	Humanos	Esporádicamente
ST10	Vacas, ovejas, cabras, primates no humanos	No
ST11	Primates no humanos	No
ST12	Primates no humanos, humanos, marsupiales	Esporádicamente
ST13	Primates no humanos, marsupiales	No
ST14	Vacas, cerdos	No
ST15	Vacas, ovejas	No
ST16	Marsupiales	No
ST17	Roedores	No
ST21	Ungulados domésticos y salvajes	No
ST23	Bovinos	No
ST24	Ungulados domésticos y salvajes	No
ST25	Ungulados domésticos	No
ST26	Ungulados domésticos	No

Así, ST10 ha sido hallado en bovinos, ovinos y artiodáctilos salvajes (Stensvold *et al.*, 2009), ST11 y ST12 en animales en cautividad en zoológicos (Parkar *et al.*, 2010) y ST13-ST17 en diferentes especies animales no humanas (Fayer *et al.*, 2012; Alfellani *et al.*, 2013b). Posteriormente ST21 y ST23-ST26 fueron identificados en una gran variedad de artiodáctilos domésticos y salvajes (Maloney *et al.*, 2019a, 2019b). Actualmente hay reconocidos un total de 22 STs, de los que ST1-ST9 y ST12 han sido hallados en humanos. En concreto, ST9 no ha sido encontrado en especies animales diferentes a la humana (Stensvold y Clark, 2020).

### 1.9.2. Morfología

*Blastocystis* sp. es un organismo extraordinariamente pleomórfico que presenta una gran variedad de formas observables en heces y/o cultivos *in vitro*, con tamaños que oscilan entre

5–40  $\mu\text{m}$ . Al menos 6 formas han sido descritas, incluyendo la vacuolar, la multivacuolar, la avacuolar, la granular, la ameboide y la quística (Figura 5).



**Figura 5.** Diversidad morfológica de *Blastocystis* sp. incluyendo (a) formas vacuolares de diferentes tamaños (indicadas por flechas) con una gran vacuola central, (b) formas granulares con gránulos distintivos relleno el espacio central, (c) forma ameboide con pseudópodos característicos, y (d) formas quísticas de pared refractaria recubiertos por una capa externa irregular. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . Fuente: Tan (2008).

La forma vacuolar es la que se observa con mayor frecuencia tanto en muestras de heces como en cultivo (Zhang *et al.*, 2007). La forma ameboide irregular ha sido sugerida como el estadio más virulento del parásito (Tan y Suresh, 2006). La forma quística de *Blastocystis* sp. confiere resistencia al medio externo y es la forma infectiva del parásito. De hecho, la transformación de la forma quística a múltiples formas vacuolares mediante división binaria ha sido demostrada experimentalmente *in vitro* (Moe *et al.*, 1999) e *in vivo* (Yoshikawa *et al.*, 2004).

*Blastocystis* sp. carece de pared celular, pero contiene orgánulos similares a mitocondrias (pero sin enzimas citocrómicas), aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso y rugoso (Salinas y Vildozola Gonzales, 2007). Su reproducción es usualmente por fisión binaria y

crece en cultivo bajo condiciones anaeróbicas; la reciente descripción del genoma completo de ST1 ha revelado que el parásito dispone de la dotación enzimática requerida en el proceso de meiosis, sugiriendo que *Blastocystis* sp. podría tener un ciclo sexual (Gentekaki *et al.*, 2017).

### 1.9.3. Clínica y patogénesis

La significancia clínica de *Blastocystis* sp. es controvertida (Tan *et al.*, 2010). Por una parte, *Blastocystis* sp. es frecuentemente reportado en individuos asintomáticos en todo el mundo. El hecho de que la prevalencia de *Blastocystis* sp. correlacione positivamente con la edad de los portadores parece apoyar la naturaleza comensal del protista (Ashford y Atkinson, 1992; Martín-Sánchez *et al.*, 1992). Más evidencia en este sentido ha sido aportada por estudios de secuenciación de nueva generación demostrando que *Blastocystis* sp. forma parte de una microbiota intestinal saludable (Tito *et al.*, 2019). Por otra parte, diferentes estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos han evidenciado una asociación entre la presencia de *Blastocystis* sp. y diferentes trastornos intestinales como diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), SII y colitis ulcerosa, así como manifestaciones extraintestinales incluyendo urticaria y anemia ferropénica, que apoyan el carácter patogénico de este protista (El Deeb y Khodeer, 2013; Rostami *et al.*, 2017; Bahrami *et al.*, 2019).

La posible asociación entre los subtipos de *Blastocystis* sp. y la ocurrencia de manifestaciones clínicas ha sido investigada en diferentes estudios moleculares. En España, el 94% de los pacientes con diarrea mono infectados por *Blastocystis* sp. eran portadores de ST4 (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009). Sin embargo, este mismo subtipo era el menos prevalente en población general asintomática (Paulos *et al.*, 2018). ST4 era también el subtipo de *Blastocystis* más frecuentemente hallado en pacientes con SII, EII o diarrea crónica en Italia (Mattiucci *et al.*, 2016), así como en pacientes con diarrea aguda en Dinamarca (Stensvold *et al.*, 2011a).

La capacidad patogénica de *Blastocystis* sp. ha sido atribuida a la secreción de proteasas y enzimas hidrolíticos por parte del parásito (Abdel-Hameed y Hassanin, 2011). Estudios *in vitro* han demostrado que extractos de *Blastocystis* sp. pueden alterar el citoesqueleto de células epiteliales, inducir apoptosis e incrementar la permeabilidad de la barrera intestinal (Puthia *et al.*, 2006). La secreción de cisteín-proteasas parece estar involucrada en fenómenos de estimulación de la mucosa intestinal, producción de interleucina 8 por parte del hospedador e inducción de procesos de inflamación intestinal (Puthia *et al.*, 2008), así como de modular y evadir la respuesta inmune del hospedador (Puthia *et al.*, 2005). Las manifestaciones extraintestinales de la blastocistosis parecen estar causadas por la acción

estimuladora de los antígenos del parásito sobre linfocitos Th2 para producir una reacción alérgica mediada por inmunoglobulina E (Pasqui *et al.*, 2004).

### 1.9.4. Diagnóstico laboratorial

El diagnóstico convencional basado en microscopía de concentrados fecales tiene una sensibilidad baja en la detección de *Blastocystis* sp. debido a la dificultad de identificar correctamente las diferentes formas bajo las que el parásito puede presentarse. Además, las técnicas de concentración habituales pueden dañar su estructura y hacerlo microscópicamente irreconocible. El método recomendado para el diagnóstico microscópico es la tinción permanente de una muestra de heces no concentrada con hematoxilina o tinción tricrómica. Con estas tinciones la microscopía presenta una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 82% y 100%, respectivamente (Stensvold, 2015).

En cuanto a los inmunoensayos, se han desarrollado métodos basados en ELISA tanto para la detección de anticuerpos contra el parásito (Zierdt *et al.*, 1995) como de sus antígenos en heces (Dogruman-Al *et al.*, 2015), con versiones comercialmente disponibles como el CoproELISA™ *Blastocystis* (Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Israel). También están comercializados varios kits basados en inmunofluorescencia como el ParaFlor™ B (Boulder Diagnostics, Boulder, CO, EEUU) y el Blasto-Fluor (Antibodies Inc., Davis, CA, EEUU). Sin embargo, la utilidad práctica de este tipo de ensayos está aún por demostrar debido a que se han usado en un número limitado tanto de muestras como de estudios epidemiológicos.

Las técnicas de cultivo de heces usando medio de Jones o medio LYSGM representan una herramienta muy útil en estudios biológicos, farmacológicos o como fuente de material de referencia (Clark y Stensvold, 2016). A pesar de que sus prestaciones diagnósticas son superiores a las de la microscopía (Suresh y Smith, 2004), su uso como método de detección de rutina está limitado por los prolongados tiempos de espera para confirmar un resultado positivo.

Por las razones anteriormente mencionadas, las técnicas moleculares basadas en PCR suponen la opción más fiable para la detección de *Blastocystis* sp. Actualmente existen disponibles una gran variedad de PCRs tanto en formato simple como múltiple (Dacal *et al.*, 2020). En la mayoría de ellas el marcador genético más frecuentemente amplificado es el gen codificante del ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (*ssu* rRNA). Usando este marcador como base de partida se han diseñado cebadores pan-*Blastocystis* que permiten la amplificación de forma robusta y fiable de todos los subtipos descritos hasta el momento en *Blastocystis* sp. (Sciocluna *et al.*, 2006). Este sistema, en combinación con la secuenciación

Sanger, es uno de los métodos más utilizado actualmente no solo para la detección, si no también para el genotipado y subgenotipado del parásito (Stensvold, 2013).

#### 1.9.5. Tratamiento y prevención

La necesidad de tratar o no las infecciones por *Blastocystis* sp. es controvertida debido a la patogenicidad incierta del organismo. El hallazgo de *Blastocystis* sp. en pacientes asintomáticos no requiere tratamiento. En pacientes con manifestaciones clínicas leves, la infección es normalmente autolimitada y se resuelve en 3-4 días sin necesidad de tratamiento alguno. En individuos sintomáticos el tratamiento generalmente se considera si la diarrea es persistente y ningún otro patógeno, aparte de *Blastocystis* sp., es identificado en especímenes fecales (Coyle *et al.*, 2012).

El metronidazol es considerado como la terapia de primera línea para la blastocistosis, demostrando su eficacia en ensayos clínicos con grupos placebo (Nigro *et al.*, 2003). Otros fármacos con eficacia probada contra *Blastocystis* sp. incluyen el trimetoprim sulfametoxazol y la nitazoxanida (Ok *et al.*, 1997; Rossignol *et al.*, 2005). El tinidazol, el ornidazol y el ketoconazol representan posibles alternativas terapéuticas, pero su eficacia clínica no está todavía convenientemente evaluada. El uso combinado de metronidazol y paromomicina (el fármaco de elección como segunda línea de tratamiento) no es efectivo y ha sido asociado a la aparición de cepas de *Blastocystis* sp. resistentes a estos fármacos (Roberts *et al.*, 2014).

La transmisión de *Blastocystis* sp. es principalmente vía fecal-oral, por lo que las medidas de prevención y control incluyen la educación para el mantenimiento de los estándares de higiene personal y comunal, así como el mejoramiento de los sistemas de saneamiento en un intento de minimizar la ingesta de agua y alimentos contaminados (Salinas y Vildozola Gonzales, 2007). El reservorio animal ha sido demostrado como fuente de infección humana (Parkar *et al.*, 2010).

#### 1.10. *Enterocytozoon bieneusi*

Microsporidia es un filo de parásitos eucariotas obligados, intracelulares y formadores de esporas capaces de infectar a un amplio rango de hospedadores desde protistas a mamíferos, incluido el ser humano (Han *et al.*, 2020). En 1857 Nägeli describió la primera especie de microsporidio, *Nosema bombycis*, y la agrupó dentro de los Schizomycetes (Nägeli, 1857). Posteriormente, en 1882, Balbiani sugirió un nuevo taxon denominado Microsporidia debido a la falta de similitud con otros schizomycetes (Balbiani, 1882). No fue hasta 1976 cuando Sprague estableció el filo Microspora dentro del Reino Protista (Sprague, 1976). Debido a la confusión existente en la taxonomía de estos organismos, Sprague y Becnel en 1998 sugirieron

denominar el filo como Microsporidia (Sprague y Becnel, 1998). Estudios basados en análisis filogenéticos de los genes  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, subunidad de la ARN polimerasa II, factores de elongación EF-1 $\alpha$  y EF-2 han podido determinar que el filo Microsporidia está relacionado con los hongos (Didier *et al.*, 2004). Además, estudios de microbioma ambiental han colocado a los microsporidios junto al filo Cryptomycota, siendo la rama basal de los hongos. Sin embargo, se requieren más estudios epidemiológicos ambientales y moleculares para resolver el origen y diversificación de los microsporidios (Han y Weiss, 2017).

Con la pandemia del VIH la microsporidiosis se ha visto incrementada tanto en países de renta baja como en los de renta alta (Stark *et al.*, 2009; Fayer y Santín, 2014). Los microsporidios están ampliamente distribuidos en la naturaleza y hasta la fecha más de 1.500 especies han sido descritas dentro de 200 géneros, de las cuales 17 especies infectan humanos produciendo microsporidiosis (Weiss y Becnel, 2014). Entre estas especies, *E. bienewsi* produce el 90% de las microsporidiosis reportadas en el mundo (Santín, 2015).

*Enterocytozoon bienewsi* se describió por primera vez en 1985 como patógeno intestinal oportunista en un paciente haitiano seropositivo a VIH y fue caracterizado mediante la técnica de microscopía electrónica (Desportes *et al.*, 1985). Este microsporidio aparece con más frecuencia en pacientes VIH positivos y en individuos con otras inmunodeficiencias. Sin embargo, *E. bienewsi* también puede afectar a individuos inmunocompetentes (Lobo *et al.*, 2012). Además, recientemente se ha reportado la presencia de *E. bienewsi* en población aparentemente sana, siendo diseminadores del microsporidio sin presentar síntomas (Sak *et al.*, 2011). Por otro lado, en países en vías de desarrollo, el acceso limitado a tratamientos antirretrovirales ha incrementado el número de individuos inmunodeprimidos, y con ello la susceptibilidad a contraer infecciones por microsporidios, siendo *E. bienewsi* el más prevalente en estas regiones (Lobo *et al.*, 2012).

Con la aparición de nuevas técnicas moleculares se han podido identificar numerosos hospedadores que son susceptibles de ser infectados por *E. bienewsi*, en los que se incluyen humanos, primates, animales de compañía y de vida salvaje (Santín y Fayer, 2011).

### 1.10.1. Taxonomía y diversidad genética

*Enterocytozoon bienewsi* pertenece a la familia Enterocytozoonidae; esta familia engloba parásitos de invertebrados marinos, siendo *E. bienewsi* la única especie de este grupo que infecta vertebrados de sangre caliente (Stentford *et al.*, 2019). Además, dentro del género *Enterocytozoon* se incluye la especie *Enterocytozoon hepatopenaei* (Tourtip *et al.*, 2009).

En base a características biológicas y moleculares ([Ruggiero et al., 2015](#)) su encuadre taxonómico es el siguiente:

Supergrupo – Opisthokonta

Filo – Microsporidia

Clase – Minisporea (= Microsporea)

Orden – Minisporida (= Minisporea)

Familia – Enterocytozoonidae

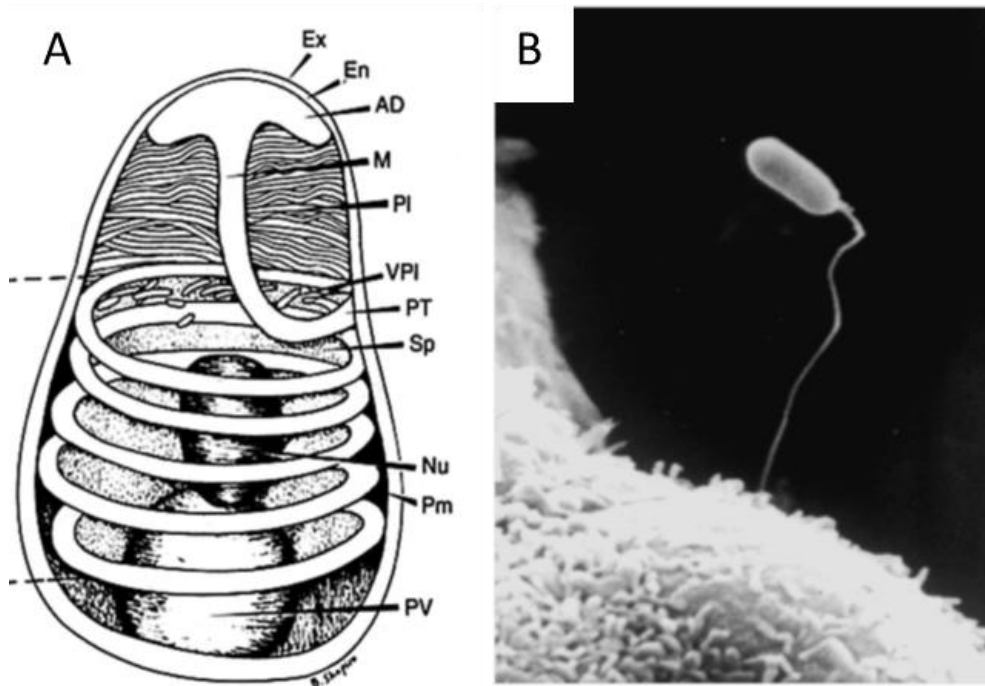
Género – *Enterocytozoon*

Actualmente, la identificación y caracterización de *E. bienersi* se basa en la amplificación y secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal del patógeno. A partir de esta región se han podido identificar más de 500 genotipos en una gran variedad de hospedadores con amplia diversidad genética entre ellos ([Fayer y Santín, 2014](#); [Li et al., 2019a](#)). Diferentes terminologías han sido utilizadas para designar los genotipos hallados, haciendo que su comparación sea complicada. Por ello, se ha propuesto una nomenclatura basada en un fragmento de 243 pb de la secuencia ITS para asignar los genotipos ([Santín y Fayer, 2009](#)). El análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de esta región ITS identifica 11 grupos, de los cuales los grupos 1 y 2 incluyen la mayoría de los genotipos descritos en animales y humanos, es decir, aquellos genotipos con potencial zoonótico. Los grupos 3–11 incluyen genotipos adaptados al hospedador o variantes genéticas identificadas en muestras ambientales, principalmente agua ([Li et al., 2019a](#)).

#### 1.10.2. Morfología

La forma infecciosa del parásito es la espora, de forma ovalada, con un tamaño de 1.0  $\mu\text{m}$  x 1.5  $\mu\text{m}$ , siendo de las esporas de microsporidio más pequeñas. Esta espora tiene tres características generales: una pared, el contenido infeccioso denominado esporoplasma y el aparato de invasión o tubo polar. La pared de la espora se divide en tres partes: una exospora compuesta de glicoproteínas, una endospora de quitina y una membrana plasmática que rodea el contenido de la espora. En el interior de la espora se diferencia un núcleo, una vacuola posterior, el disco de anclaje y el tubo polar. Este tubo polar es único de los microsporidios y es imprescindible para llevar a cabo la invasión del hospedador ([Didier et al., 2004](#); [Han y Weiss 2017](#)). Una vez ingerida, debido a cambios de pH, presión osmótica y tras entrar en contacto con el enterocito, la espora descarga el tubo polar inyectando el esporoplasma y núcleo en el citoplasma de la célula huésped. Se inicia así la infección, seguida

de una multiplicación por fisión binaria o esquizogonia. Finalmente, la maduración de las esporas se produce por esporogonia. Estas esporas rompen la célula y son excretadas con las heces en el ambiente para comenzar de nuevo el ciclo ([Santín y Fayer, 2011](#)).



**Figura 6.** Espora de microsporidio. (A) Dibujo esquemático de espora de microsporidio indicando sus componentes: EX: Exospora; En: Endospora; AD: Disco de anclaje, M: membrana, PI: Polaroplasto, PT: tubo polar, VPI: Polaroplasto vesicular, Sp: esporoplasma, Nu: Núcleo, Pm: membrana plasmática, PV: Vacuola posterior. (B) Espora de microsporidio infectando células vero E6 visualizado por microscopía electrónica de barrido. Fuente: [Han y Weiss \(2017\)](#).

### 1.10.3. Clínica y patogénesis

El periodo de incubación de la microsporidiosis por *E. bienewsi* solo ha sido documentado en un estudio de cohortes en Suecia asociado a un brote alimentario, sugiriendo 7 días entre la infección y comienzo de la sintomatología ([Decreane et al., 2012](#)). Las infecciones por *E. bienewsi* suelen estar limitadas al tracto gastrointestinal, relacionándose con la apoptosis de enterocitos del duodeno y yeyuno ([Santín, 2015](#)). Las manifestaciones clínicas incluyen diarrea, náusea, dolor abdominal y fiebre. En personas inmunodeprimidas (pacientes geriátricos, trasplantados, VIH seropositivos, pacientes con cáncer) la diarrea es más persistente y conlleva la pérdida de peso porcentual ([Lores et al., 2002](#); [Weiss y Becnel, 2014](#)). En el caso de individuos inmunocompetentes la diarrea es autolimitada debido al control de la infección por el sistema inmune ([Weiss y Becnel, 2014](#)). Sin embargo, *E. bienewsi* puede diseminarse a otras partes del organismo ya que se han documentado casos por infección del tracto respiratorio y

biliar produciendo tos, disnea, asma y colangitis biliar, respectivamente (Weber *et al.*, 1992; Pol *et al.*, 1992; Nétor Velásquez *et al.*, 2012).

Además, se ha reportado la reactivación de la infección latente (asintomática) por *E. bienewisi* cuando existe inmunosupresión (Lobo *et al.*, 2012). En países desarrollados la infección por este microsporidio está disminuyendo considerablemente debido a la aparición de la terapia antirretroviral. No obstante, el número de casos en pacientes trasplantados bajo una terapia inmunosupresora se ha visto incrementado, ocasionando enfermedad días o años después del trasplante (Galván *et al.*, 2011).

#### 1.10.4. Diagnóstico laboratorial

A pesar de que la microscopía convencional apoyada con la inmunofluorescencia directa ha sido utilizada para la identificación de microsporidios en muestras fecales, estas técnicas no permiten diferenciar la especie. Estos métodos requieren colorantes como cromotrope 2R, Uvitex 2B o tinción de blanco con calcoflúor para aumentar la especificidad y sensibilidad (Didier *et al.*, 2004). Por el contrario, la microscopía electrónica de transmisión es la técnica de referencia para la identificación de microsporidios basada en la visualización del tubo polar del patógeno. Sin embargo, este método no es utilizado en el diagnóstico de rutina debido al coste económico y tiempo que conlleva su realización (Weber *et al.*, 2000).

Otra técnica con mejor resultado que la microscopía es el ensayo de hibridación fluorescente *in situ* utilizando sondas de oligonucleótidos marcados con fluorescencia, dirigidos a secuencias específicas del microsporidio, siendo éste un método específico de especie (Gracyk *et al.*, 2007).

En los últimos años, los métodos moleculares basados en PCR y análisis de secuencias han desplazado los métodos convencionales debido a su considerable especificidad y sensibilidad diagnóstica (Santín, 2015). Actualmente para la identificación y caracterización se está usando como marcador la región ITS del microsporidio. Para ello, se han desarrollado PCR anidadas utilizando diferentes pareja de cebadores (MSP1/MSP2B y MSP3/MSP4B, EBITS3/EBITS4 y EBITS1/EBITS2.4, AL4037/AL4039 y AL4038/ALA040) para amplificar la región de 243 pb ITS y una porción pequeña del gen *ssu* rRNA (Li *et al.*, 2019a). Debido a la gran cantidad de genotipos descritos y la limitación de discriminación de la región ITS entre estas variantes, se han desarrollado técnicas de genotipado multilocus de secuencias para conocer en mejor medida la epidemiología del microsporidio (Feng *et al.*, 2011). Además, hay disponibles PCR múltiples comerciales como ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR kit (Ademtech, Francia) para la detección simultánea de este y otros patógenos intestinales como

*E. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. con una elevada sensibilidad (92%) y especificidad (100%) (Morio *et al.*, 2019).

### 1.10.5. Tratamiento y prevención

Actualmente, el número de fármacos disponibles para el tratamiento de la microsporidiosis por *E. bienewsi* es muy limitado. El albendazol, un benzimidazol que inhibe la polimerización de la tubulina, es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la microsporidiosis (Han y Weiss, 2018). A pesar de que su efectividad ha sido demostrada en una gran variedad de microsporidios, en el caso de *E. bienewsi* tiene un efecto parasitostático más que parasiticida, reduciendo la diarrea sin eliminar la infección (Goetz *et al.*, 2001). La falta de sensibilidad ante este fármaco se ha asociado a cambios de aminoácidos en el gen de la  $\beta$ -tubulina del patógeno (Akiyoshi *et al.*, 2007).

Por otro lado, la fumagilina, un inhibidor de la metionina aminopeptidasa tipo 2 (MetAP2), es altamente efectivo para la eliminación del microsporidio, pero puede causar trombocitopenia en pacientes inmunodeprimidos (Champion *et al.*, 2010). Sin embargo, uno de los análogos de la fumagilina, TNP-470, ha demostrado ser efectivo y menos tóxico en aquellos pacientes infectados con esporas de *E. bienewsi* (Han y Weiss, 2018).

Debido a la falta de opciones terapéuticas eficaces para tratar infecciones por *E. bienewsi*, se ha empezado a buscar nuevas estrategias para eliminar el patógeno sin producir toxicidad. Recientemente la nitazoxanida, un fármaco con actividad frente a un gran rango de parásitos, incluyendo protozoos flagelados, amebas y helmintos (Costa y Weiss, 2000), ha demostrado ser efectivo frente a la microsporidiosis producida por *E. bienewsi* (Saffo y Mirza, 2019). La falta de fármacos disponibles para el tratamiento de *E. bienewsi* se debe a que no ha podido ser cultivado *in vitro* y esto limita el desarrollo de nuevos fármacos (Han y Weiss, 2018; Vivesvara, 2002). Por lo tanto, las medidas para minimizar el riesgo de infección por este microsporidio en aquellos grupos de riesgo que puedan desarrollar la enfermedad incluirían la mejora de las prácticas higiénicas (lavado de manos, limpieza de productos vegetales, ingesta de agua embotellada) y minimizar el contacto con animales (Santín, 2015).

Cabe destacar que, en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana, la aparición de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha reducido las infecciones oportunistas por microsporidios dado a que se restauran los niveles de los linfocitos T CD4+ y con ello el sistema inmune (Van Hal *et al.*, 2007).

### 1.11. Epidemiología de las infecciones por protistas entéricos en España

#### 1.11.1. Prevalencia en poblaciones humanas

La epidemiología de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en España ha sido revisada por Navarro-i-Martinez *et al.* (2011) y Carmena *et al.* (2012), y más recientemente por Köster y Carmena (2020). La mayoría de la información disponible proviene de estudios observacionales transversales realizados en niños en edad escolar mediante microscopía convencional en las últimas dos décadas del siglo XX. Estos trabajos reportaron prevalencias de giardiasis del 3–7% en individuos asintomáticos y del 13–25% en individuos sintomáticos (mayoritariamente con diarrea). Además de en poblaciones pediátricas (p.e. Pedraza Dueñas *et al.*, 1994; Jarabo *et al.*, 1995; Pérez Armengol *et al.*, 1997), la enfermedad también ha sido investigada en pacientes ambulatorios (González-Moreno *et al.*, 2011), población reclusa (Alonso-Sanz *et al.*, 1995) e inmigrante (López-Vélez *et al.*, 2003). A título comparativo, hay que mencionar también que las infecciones por *G. duodenalis* son frecuentes en animales de producción y de compañía, siendo detectadas en ovinos (3–44%), bovinos (5–30%), perros (5–20%) y gatos (14%) domésticos, así como en animales de vida libre (Tabla 6). La distribución temporal de la giardiasis humana en España no presenta picos estacionales relevantes, aunque en bovinos la enfermedad es más frecuente en los meses de primavera (Castro-Hermida *et al.*, 2009).

En términos generales, *Cryptosporidium* spp. es mucho menos prevalente que *G. duodenalis* en España. La infección es más frecuentemente identificada en individuos con afecciones gastrointestinales (5–30%) que en individuos asintomáticos (1–5%). Al igual que la giardiasis, los casos de criptosporidiosis son reportados principalmente en población pediátrica incluyendo niños en edad preescolar (Mateo *et al.*, 2014) y escolar (García-Rodríguez *et al.*, 1990), niños(as) sintomáticos atendidos en centros médicos (Clavel *et al.*, 1996b; Moles *et al.*, 1998) y niños portadores de VIH (Del Águila *et al.*, 1997). Este patógeno también ha sido hallado en pacientes adultos VIH positivos (Clavel *et al.*, 1995; López-Vélez *et al.*, 1995) así como en población reclusa (Alonso-Sanz *et al.*, 1995) e inmigrante (López-Vélez *et al.*, 2003). También se han reportado casos de criptosporidiosis extraintestinal afectando el tracto respiratorio principalmente en individuos inmunodeprimidos (López-Vélez *et al.*, 1995; Clavel *et al.*, 1996a). Los casos de criptosporidiosis han sido más frecuentemente identificados a finales de verano y principio de otoño en población general en La Rioja (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017), y en los meses de otoño/invierno en niños de Aragón (Clavel *et al.*, 1996b) y de la provincia de Salamanca (Rodríguez-Hernández *et al.*, 1996). Finalmente, se han documentado brotes de criptosporidiosis transmitidos persona-persona en niños en centros de educación

infantil en Granada (Goñi *et al.*, 2015), Madrid (Rodríguez-Salinas *et al.*, 2000) y Zaragoza (Ortega *et al.*, 2006), y de origen incierto en Navarra (Fuentes *et al.*, 2015). En cuanto al reservorio animal, las infecciones por *Cryptosporidium* spp. son comúnmente identificadas en terneros (4–60%) y corderos (5–90%) con diarrea. Por el contrario, el parásito ha sido descrito en prevalencias del 7–15% y del 5–10% en perros y gatos domésticos asintomáticos, respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6.** Datos sobre la vigilancia epidemiológica, la prevalencia y las limitaciones en la investigación de la giardiosis, la criptosporidiosis y la blastocistosis en España.

	<i>Giardia duodenalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Blastocystis</i> sp.
<b>Vigilancia</b>			
¿Declaración obligatoria?	Sí <sup>3</sup>	Sí <sup>3</sup>	No
No. oficial de casos <sup>1</sup>	1.627	646	Desconocido
¿Series históricas?	No	No	No
¿Investigación de brotes?	Limitado	Limitado	No
¿Legislación en aguas/alimentos?	No	No	No
<b>Prevalencia<sup>2</sup> (%)</b>			
Humanos (asintomáticos)	3–7	1–5	3–22
Humanos (sintomáticos)	13–25	5–30	8–23
Ovinos	3–44	5–90	Desconocido
Bovinos	5–30	4–60	2
Perros	5–20	7–15	0
Gatos	14	5–10	0
Fauna salvaje	1–16	1–27	2
Aguas de superficie	25–100	15–90	Desconocido
Alimentos frescos	16–50	20–60	Desconocido
<b>Investigación</b>			
¿Estudios de genotipado?	Limitado	Limitado	Limitado
¿Estudios de transmisión?	Limitado	Limitado	Limitado

<sup>1</sup> Casos confirmados reportados al Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) en 2015.

<sup>2</sup> Fuente: Navarro-i-Martinez *et al.* (2011); Carmena *et al.* (2012); Paulos *et al.* (2018); Köster y Carmena (2020).

<sup>3</sup> Desde marzo de 2015.

En España la presencia de *E. histolytica* ha sido identificada mayoritariamente en colectivos de inmigrantes (López-Vélez *et al.*, 2003; Cobo *et al.*, 2016) y viajeros provenientes de áreas endémicas (Roure *et al.*, 2019). Durante décadas se ha aceptado implícitamente que todos los casos de amebiosis intestinal y absceso hepático amebiano detectados tenían exclusivamente este origen. Sin embargo, esta visión fue cuestionada con la detección de la enfermedad en pacientes autóctonos sin historial de viajes al extranjero (Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2009). Estudios más recientes han demostrado que la infección es frecuente en personas homosexuales en Barcelona (Fernández-Huerta *et al.*, 2019), incluso dando lugar a brotes

epidémicos (Escolà-Vergé *et al.*, 2017). Los quistes de este patógeno también ha sido hallados en aguas de regadío y aguas residuales no tratadas (Moreno *et al.*, 2018; Benito *et al.*, 2020).

En comparación con *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., la información epidemiológica disponible en España sobre *Blastocystis* sp. es mucho menor. Este microorganismo ha sido reportado en prevalencias del 3–23% en estudios basados en microscopía llevados a cabo en niños en edad preescolar y escolar (Martín-Sánchez *et al.*, 1992), niños con síntomas gastrointestinales (Méndez Bustelo *et al.*, 2015) y con infección por VIH (Del Águila *et al.*, 1997), niños extranjeros acogidos en España (Soriano *et al.*, 2011) y pacientes ambulatorios (González-Moreno *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2016). *Blastocystis* sp. ha sido identificado en cerdos en intensivo (Navarro *et al.*, 2008), en avestruces de granja (Ponce Gordo *et al.*, 2002) y en carnívoros salvajes (Calero-Bernal *et al.*, 2020), pero no en perros ni gatos domésticos (Paulos *et al.*, 2018).

Finalmente, *E. bienewisi* ha sido identificado principalmente en individuos inmunodeficientes incluyendo pacientes con VIH/SIDA (del Águila *et al.*, 1997), receptores de trasplante de órgano sólido (Galván *et al.*, 2011), viajeros provenientes de áreas endémicas (López-Vélez *et al.*, 1999), y personas de avanzada edad (Lores *et al.*, 2002). En menor medida, la población general inmunocompetente también puede verse afectada por este parásito (Abreu-Acosta *et al.*, 2005). Este microsporidio también ha sido hallado en carnívoros de vida libre en diversas regiones españolas (Santín *et al.*, 2018) y en perros y gatos domésticos en la provincia de Álava (Dashti *et al.*, 2019).

#### 1.11.2. Diversidad genética en poblaciones humanas

La diversidad molecular de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., y en mucha menor medida, *Blastocystis* sp. y *E. bienewisi*, en poblaciones humanas en España ha sido investigada principalmente en individuos recibiendo atención médica con o sin manifestaciones clínicas. En algunos casos, las nuevas técnicas de qPCR múltiple ya en funcionamiento en muchos hospitales de tercer nivel, permiten la identificación casual de estos microorganismos durante el diagnóstico de rutina en el laboratorio clínico. Este hecho es particularmente cierto para *Blastocystis* sp. y *D. fragilis*, demostrando que ambos parásitos son mucho más frecuentes de lo inicialmente esperado.

Como regla general, el *assemblage* B de *G. duodenalis* ha sido más prevalentemente hallado que el *assemblage* A en poblaciones clínicas de Aragón (Sahagún *et al.*, 2008), Galicia (Gabín-García *et al.*, 2017) y Madrid (de Lucio *et al.*, 2015), aunque en otro estudio realizado en pacientes de atención primaria en La Rioja ambos *assemblages* fueron identificados en

similares proporciones (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). A nivel de subgenotipo, el sub-*assemblage* BIV es la variante genética de *G. duodenalis* más comúnmente observada no solo en población clínica, sino también en niños de educación infantil (Mateo *et al.*, 2014) y primaria (Cardona *et al.*, 2011), así como en población general asintomática (de Lucio *et al.*, 2017). Considerados de forma conjunta, estos datos sugieren que el genotipo del parásito no es un factor determinante en la progresión de la infección hasta enfermedad sintomática. Por el contrario, un estudio reciente incluyendo pacientes de todos los grupos etarios con y sin síntomas gastrointestinales provenientes de diferentes regiones españolas ha revelado que los niños estaban más frecuentemente infectados por el *assemblage* B de *G. duodenalis* que los adultos, y que el *assemblage* A era más prevalente que el B en individuos con infecciones asintomáticas (Wang *et al.*, 2019). Es también reseñable que las infecciones subclínicas por *G. duodenalis* son habituales en niños menores de 6 años aparentemente sanos (Mateo *et al.*, 2014). Este hecho tiene importantes consecuencias en epidemiología y salud pública, ya que los portadores asintomáticos pueden ser una fuente de infección inadvertida para poblaciones de riesgo incluidos otros niños, ancianos y personas inmunodeprimidas.

En el caso de la criptosporidiosis, la gran mayoría de los casos reportados en España son causados por *C. hominis* (80–90%) y *C. parvum* (10–18%) (de Lucio *et al.*, 2016b; Segura *et al.*, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017), aunque estas frecuencias pueden variar en función del área geográfica considerada. Por ejemplo, en Galicia era *C. parvum*, y no *C. hominis*, la especie más prevalente circulando en poblaciones humanas de áreas rurales durante el periodo 2000–2008, con picos estacionales en los meses estivales (Navarro-I-Martínez *et al.*, 2013; Abal-Fabeiro *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que la cría de vacuno de carne y de leche es una de las principales actividades agrícolas en esta región española, estos datos indican que muchos de los casos de criptosporidiosis humana por *C. parvum* detectados en Galicia pueden tener un origen zoonótico. De forma más esporádica, también se han identificado infecciones por especies de *Cryptosporidium* menos frecuentes como *C. meleagridis* (Abal Fabeiro *et al.*, 2014; Segura *et al.*, 2015), *C. canis* (Abal-Fabeiro *et al.*, 2014), *C. felis* (Llorente *et al.*, 2006; Cieloszyk *et al.*, 2012; de Lucio *et al.*, 2016b), *C. cuniculus* (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016) y *C. ubiquitum* (Cieloszyk *et al.*, 2012). Estas especies infectan primariamente aves, perros y conejos, lo que demuestra que estos hospedadores animales pueden servir como fuente de infección ocasional de infección humana. Los estudios epidemiológicos moleculares anteriormente mencionados han evidenciado que los subgenotipos IbA10G2 de *C. hominis* y IIdA15G2 de *C. parvum* son las variantes genéticas más comúnmente identificadas en la población humana española. Considerando de forma conjunta los datos moleculares

disponibles para *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. se puede afirmar que, como regla general, la transmisión de la giardiosis y la criptosporidiosis humana en España es principalmente de origen antroponómico, siendo minoritarias las infecciones de origen zoonótico a partir de animales de producción o de compañía (Abal-Fabeiro *et al.*, 2014, 2015; Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017; de Lucio *et al.*, 2017).

Comparativamente, mucha menos información existe actualmente sobre la diversidad genética de las infecciones causadas por *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* en España. En el caso de *E. histolytica*, diversos estudios han demostrado variaciones significativas en las secuencias de los marcadores SREHP y SSG en aislados procedentes de diferentes áreas geográficas (Clark y Diamond, 1993; Samie *et al.*, 2008). Sin embargo, no existe actualmente ningún sistema estandarizado que discrimine y ordene las variantes genéticas identificadas, por lo que este tipo de análisis son llevados a cabo en raras ocasiones. Respecto a *Blastocystis* sp., ST4 ha sido identificado como el subtipo del parásito más prevalente (94%) en pacientes sintomáticos monoinfectados en Valencia (Dominguez-Marquez *et al.*, 2009). El hecho de que ST4 sea minoritario (por detrás de ST1-ST3) en población general asintomática (Paulos *et al.*, 2018), parece indicar que este subtipo de *Blastocystis* sp. está más asociado a patogenia. Finalmente, en el único estudio de caracterización molecular de *E. bienersi* llevado a cabo en España hasta la fecha en humanos, el genotipo D del parásito ha sido detectado en dos pacientes con trasplante de órgano sólido (Galván *et al.*, 2011).

#### 1.11.3. Limitaciones y necesidades en investigación

La giardiosis y la criptosporidiosis, pero no la amebiosis, la blastocistosis o las microsporidiosis, forman parte del listado de enfermedades de declaración obligatoria en España desde marzo de 2015. El registro de casos se lleva a cabo en el Centro Nacional de Epidemiología (CNE, ISCIII), dentro de la red de vigilancia epidemiológica nacional de las enfermedades transmisibles a partir de los datos aportados por los servicios de vigilancia de las comunidades autónomas. Según datos oficiales, en 2015 se registraron en el país 1.627 casos confirmados de giardiosis y 646 casos confirmados de criptosporidiosis (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades, 2018a,b). En los últimos informes publicados por el CNE, en 2016 se registró un descenso ( $n = 243$ ) de los casos de criptosporidiosis y un aumento ( $n = 2.063$ ) de los casos de giardiosis notificados respecto al año anterior (Centro Nacional de Epidemiología, 2017, 2018). Obviamente, estas cifras representan una fracción de los casos reales existentes. Entre las razones que explican la importante subdeclaración de ambas enfermedades se encuentran el comportamiento variable de las personas con síntomas compatibles con giardiosis/criptosporidiosis (no todos los pacientes sintomáticos acuden a su

médico de atención primaria), el desconocimiento o baja percepción de la necesidad de detectar enteroparásitos de algunos profesionales sanitarios, la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos no moleculares y el elevado número de casos diagnosticados pero no notificados a la red de vigilancia epidemiológica nacional. Cuando la incertidumbre asociada a estas variables es tenida en cuenta, se ha estimado que el número de casos reales tiene una magnitud de orden 2–3 superior al de casos declarados (Cacciò y Chalmers, 2016). Al no ser enfermedades de declaración obligatoria, la situación epidemiológica de la amebiosis, la blastocistosis y la microsporidiosis por *E. bienewisi* en España es desconocida en gran medida, sobre todo en población general asintomática (Tabla 6).

Como consecuencia directa de lo anteriormente expuesto, no existen en España series históricas a escala nacional sobre la incidencia de estas enfermedades a lo largo del tiempo. Los escasos datos disponibles sobre la estacionalidad de estos patógenos provienen de estudios de ámbito regional llevados a cabo durante periodos de tiempo relativamente breves, insuficientes para determinar tendencias de forma concluyente. Por ejemplo, se ha observado un mayor número de casos humanos por criptosporidiosis en los meses finales del verano y principio de otoño en Galicia (Abal-Fabeiro *et al.*, 2015) y La Rioja (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). Este mismo patrón de distribución temporal ha sido largamente documentado en diversos países europeos, principalmente en Reino Unido (Chalmers *et al.*, 2009), pero también en Alemania y Holanda (Fournet *et al.*, 2013), y ha sido asociado tanto al uso de aguas recreativas como a estancias vacacionales en el extranjero.

En España, los estudios epidemiológicos moleculares orientados a determinar la ocurrencia y diversidad genética de protistas enteroparásitos en poblaciones animales no humanas y muestras ambientales son escasos (Navarro-i-Martinez *et al.*, 2011; Carmena *et al.*, 2012; Paulos *et al.*, 2018) (Tabla 6). También son inexistentes los estudios estadísticos adecuadamente diseñados para determinar de forma precisa qué variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas pueden estar asociadas con un mayor riesgo de infección por estos microorganismos. En conjunto, este tipo de estudios son esenciales para determinar fuentes de infección, potencial zoonótico, vías de transmisión y factores de riesgo.

Las técnicas moleculares (incluyendo PCR y secuenciación) son herramientas extremadamente potentes y versátiles que deberían ser incorporadas de forma rutinaria en la vigilancia epidemiológica activa de estas enfermedades. Su utilidad ha sido ampliamente demostrada tanto en el estudio de brotes epidémicos (Fuentes *et al.*, 2015; Goñi *et al.*, 2015), como para la identificación de nuevas especies/genotipos circulantes en la población española (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016; Merino *et al.*, 2019; Millán *et al.*, 2019).

Finalmente, en España no existe una legislación que regule específicamente la concentración máxima de (oo)quistes y esporas de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp., *Blastocystis* sp. y microsporidios, incluyendo *E. bieneusi*, permitida en aguas y alimentos para consumo humano. Tampoco existen programas de vigilancia epidemiológica rutinaria para su monitorización en estas matrices.

## 1.12. Epidemiología de las infecciones por protistas entéricos en Mozambique

### 1.12.1. Prevalencia en poblaciones humanas

La epidemiología de las principales especies de protistas enteropatógenos en Mozambique es en gran medida desconocida. La fuente de información más fiable disponible actualmente proviene del proyecto GEMS, un estudio prospectivo de casos-control estratificado pareado por sexo y edad en el que durante 36 meses se estudiaron 22.568 niños menores de 5 años con diarrea moderada o severa provenientes de cuatro países africanos (Gambia, Mali, Kenia y Mozambique) y tres asiáticos (Bangladesh, India y Pakistán) (Kotloff *et al.*, 2013). En este proyecto, *Cryptosporidium* spp. fue identificado como el segundo patógeno más importante causante de diarrea tras rotavirus (Kotloff *et al.*, 2019). En Mozambique, *G. duodenalis* fue detectado más prevalentemente en el grupo de niños control que en el de casos con diarrea (Acácio *et al.*, 2019). Este mismo efecto protector del parásito ha sido previamente documentado en un estudio similar llevado a cabo en Tanzania (Tellevik *et al.*, 2015).

En Mozambique, *G. duodenalis* ha sido reportada mediante microscopía convencional en tasas del 1–6% en población pediátrica portadora (Fonseca *et al.*, 2014) y no portadora (Mandomando *et al.*, 2007) de VIH en la capital, Maputo, así como en población clínica general con y sin VIH (Cerveja *et al.*, 2017) en esa misma ciudad. Usando técnicas de detección con una mayor sensibilidad diagnóstica, el parásito ha sido hallado por PCR en el 8% de los pacientes con VIH y/o tuberculosis (TB) en el distrito de Chowke (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en el 37% de la población general de una zona de alta endemicidad en Beira (Meurs *et al.*, 2017). Tasas de infección del 14–50% han sido documentados en niños con diarrea investigados mediante ELISA en Manhiça, una zona rural cercana a Maputo (Nhampossa *et al.*, 2015; Acácio *et al.*, 2019). En un estudio reciente llevado a cabo en niños  $\leq 14$  años con diarrea atendidos en 6 centros médicos de cuatro provincias la prevalencia de *G. duodenalis* encontrada mediante ELISA fue del 10% (Bauhofer *et al.*, 2020).

*Cryptosporidium* spp. ha sido detectado por PCR en el 8% de pacientes afectados por VIH y/o TB en Chowke (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en adultos con diarrea en Maputo

(Casmó *et al.*, 2018). En población pediátrica con diarrea se han documentado tasas de infección mediante ELISA del 19–38% en el área de Maputo (Nhampossa *et al.*, 2015; Acácio *et al.*, 2019) y del 12% a escala nacional (Bauhofer *et al.*, 2020).

La información disponible en Mozambique sobre *E. histolytica* es algo más abundante, aunque debe ser críticamente interpretada. Por ejemplo, un estudio a escala nacional ha reportado una prevalencia global de 31% por microscopía (Augusto *et al.*, 2009), una técnica que no permite diferenciar *E. histolytica* de otras especies de amebas comensales morfológicamente idénticas. Este hecho cuestiona la validez de los datos obtenidos en estudios epidemiológicos basados exclusivamente en microscopía para la detección de este patógeno. De hecho, estudios realizados por PCR han demostrado que la mayoría de estas infecciones eran debidas a *E. dispar* (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017). Usando esta misma técnica, la ocurrencia de la infección hallada en población clínica en Beira fue del 10% (Meurs *et al.*, 2017). Usando ELISA como método diagnóstico se han descrito tasas de infección en poblaciones pediátricas con diarrea del 2% a nivel nacional (Bauhofer *et al.*, 2020) y del 13% en el distrito de Manhica (Acácio *et al.*, 2019).

Respecto a *Blastocystis* sp., el 21% de los niños en edad escolar investigados en Marrere (Guidetti *et al.*, 2011) y el 13% de los pacientes con VIH y/o TB en el distrito de Chowke (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) eran portadores de este microorganismo. Ambos estudios fueron realizados usando microscopía convencional como técnica de diagnóstico. La ocurrencia de *Blastocystis* sp. fue del 21% en población general asintomática en Beira analizada mediante PCR (Meurs *et al.*, 2017). En este mismo estudio, *E. bienewisi* fue detectado en el 9% de la población investigada (Meurs *et al.*, 2017).

Finalmente, varios trabajos han sido enfocados a determinar los factores de riesgo asociados a la morbilidad y mortalidad por patógenos entéricos en niños menores de 5 años en Maputo (Knee *et al.*, 2018) y Manhica (Nhampossa *et al.*, 2015; Acácio *et al.*, 2019). Todos ellos coincidieron en identificar la falta de acceso a agua potable, las condiciones de insalubridad y la carencia de infraestructuras de saneamiento como los principales factores que impiden el control de la transmisión de estos agentes infecciosos.

Debido a la escasez de datos disponibles en Mozambique sobre *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. y *E. bienewisi*, para dimensionar su relevancia en el contexto africano se ha procedido a resumir la epidemiología de estos protistas entéricos a partir de estudios representativos publicados en otros países de este continente. Esta información se presenta tabulada en los Anexos II, IV, VI, VII y IX.

### 1.12.2. Diversidad genética en poblaciones humanas

Si la información sobre la ocurrencia de protistas entéricos en poblaciones humanas en Mozambique ya es de por sí limitada, los datos moleculares sobre la diversidad genética de estos patógenos son aún más escasos o incluso inexistentes. El genotipado y subgenotipado de aislados de *G. duodenalis* ha sido investigado hasta el momento en un único trabajo en el que los sub-*assemblages* All y BIV del parásito fueron hallados en idénticas proporciones en pacientes con VIH y TB en el distrito de Chowke ([Irisarri-Gutiérrez et al., 2017](#)). En ese mismo estudio se detectó la presencia de los subtipos de *C. hominis* IbA10G2 y IdA22 en un número limitado de muestras ([Irisarri-Gutiérrez et al., 2017](#)). El subtipo de *C. parvum* IlcA5G3 fue el más frecuentemente hallado en población pediátrica con diarrea en el distrito de Manhiça ([Sow et al., 2016](#)), mientras que los subtipos IaA23R3, IlcA5G3d, y IleA12G1 han sido descritos en adultos con diarrea en Maputo ([Casmó et al., 2018](#)). No existen datos publicados en el país sobre la epidemiología molecular de *Blastocystis* sp. y microsporidios incluyendo *E. bienewisi*.

Debido a la escasez o inexistencia de datos disponibles en Mozambique sobre *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. y *E. bienewisi*, para dimensionar su relevancia en el contexto africano se ha procedido a resumir la diversidad molecular de estos protistas entéricos a partir de estudios representativos publicados en otros países de este continente. Esta información se presenta tabulada en los [Anexos III, V, VIII y IX](#).

### 1.12.3. Limitaciones y necesidades en investigación

La situación real de la giardiasis, la criptosporidiosis, la amebiosis, la blastocistosis y la microsporidiosis por *E. bienewisi* en Mozambique es prácticamente desconocida a escala nacional, ya que los escasos estudios epidemiológicos realizados hasta el momento son de ámbito local o regional y no necesariamente reflejan la situación general del país. Los retos para ahondar en el conocimiento de estas enfermedades en Mozambique son múltiples y de difícil abordaje. Un factor clave es la carencia de una red nacional de vigilancia epidemiológica eficiente donde se puedan reportar los casos confirmados en los laboratorios clínicos y microbiológicos del sistema de salud pública. Al no existir datos oficiales y muy pocos estudios científicos publicados sobre la incidencia y prevalencia de estos patógenos en poblaciones humanas, se desconoce completamente su distribución geográfica y su variabilidad estacional. Tampoco existen estudios dirigidos a conocer su presencia en poblaciones de animales de producción, domésticos o de vida libre, por lo que la contribución del reservorio animal como fuente de infección humana es desconocida. La misma situación es extrapolable al estudio de muestras ambientales, principalmente de aguas superficiales destinadas al consumo humano, muy probablemente una de las principales vías de infección humana y animal en el país.

Finalmente, pero no menos importante, no existen prácticamente datos moleculares sobre la frecuencia y diversidad genética de especies/genotipos, información ésta esencial para caracterizar la transmisión dinámica de estos patógenos.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

La epidemiología de las principales especies de protozoos (*Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*), estramenópilos (*Blastocystis* sp.) y microsporidios (*Enterocytozoon bieneusi*) causantes de enfermedad gastrointestinal en poblaciones pediátricas está insuficientemente estudiada tanto en países de baja renta como en países de renta media y alta. Entre las principales limitaciones que dificultan el conocimiento de la transmisión de estos patógenos y su relevancia real en salud pública se encuentran la falta de datos moleculares sobre su heterogeneidad genética intra- e interespecie, así como de los factores protectores o de riesgo asociados a estas infecciones. Tomando como base de partida esta situación, los objetivos principales de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Determinar, mediante el uso de técnicas moleculares, la prevalencia, frecuencia y diversidad genética de las principales especies de protistas entéricos asociadas a diarrea en:
  - a) Una población pediátrica asintomática de la Comunidad Autónoma de Madrid, España (país de renta media-alta y baja endemicidad).
  - b) Una población pediátrica sintomática y asintomática de la provincia de Zambézia, Mozambique (país de renta baja y alta endemicidad).
2. Determinar, mediante el uso de encuestas epidemiológicas y análisis estadísticos de regresión logística univariante y multivariante, los factores asociados a una mayor probabilidad de infección por estos patógenos en las poblaciones pediátricas investigadas en España y Mozambique.
3. Comparar los datos moleculares y estadísticos obtenidos en los dos escenarios (endémico y no endémico) considerados e identificar factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos que contribuyan a explicar la transmisión dinámica de estos protistas entéricos.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Diseño y justificación del proyecto de investigación

El presente trabajo está basado en la realización, de forma independiente pero complementaria, de dos estudios epidemiológicos prospectivos y transversales dirigidos a investigar, mediante el uso de herramientas moleculares, la prevalencia y diversidad genética de las principales especies de protistas entéricos potencialmente causantes de diarrea en poblaciones pediátricas provenientes de un área de baja endemicidad y renta media-alta (España) y otra de alta endemicidad y renta baja (Mozambique). En ambos escenarios epidemiológicos las muestras biológicas de partida fueron heces proporcionadas por los niños participantes en el proyecto.

La decisión de utilizar técnicas moleculares para la detección de protistas entéricos se basó en las ventajas asociadas a esta metodología descritas en la sección 1.5., principalmente sus elevadas prestaciones diagnósticas en términos de sensibilidad y especificidad y la posibilidad de determinar especies, genotipos y subgenotipos mediante secuenciación Sanger. Aunque la microscopía convencional fue inicialmente considerada en el estudio como técnica complementaria, este método fue finalmente descartado debido a i) la conservación subóptima de las muestras de heces provenientes de Mozambique, que hacía muy difícil la correcta identificación de las formas parasitarias presentes en heces y ii) la inasumible carga de trabajo asociada a este método.

La decisión de centrar el estudio en población pediátrica se basó en i) este grupo etario es el más comúnmente afectado por los protistas enteroparásitos objeto del presente trabajo, ii) los muestreos en población pediátrica escolar son logísticamente más sencillos de realizar que en otros grupos poblacionales, y iii) la escasa información disponible sobre la epidemiología de estos patógenos en niños con infecciones subclínicas.

El estudio en España fue llevado a cabo en niños asintomáticos en el municipio de Leganés de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). Para la elección de esta área geográfica se aprovecharon dos circunstancias: i) la existencia previa de una sólida red colaborativa de centros educativos establecida por la Dra. Esther Ruiz Chércoles, médico pediatra en el Centro de Salud María Jesús Hereza de Leganés, para el desarrollo de campañas de promoción de hábitos saludables en la población escolar de Leganés, y ii) la presencia en este municipio del Hospital Universitario Severo Ochoa, centro con el que el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología (LRIP) del Centro Nacional de

Microbiología (CNM) colabora asiduamente, y que remite regularmente al LRIP muestras de heces de pacientes sintomáticos con un diagnóstico positivo a algunas de las especies de protistas enteroparásitos investigadas en este trabajo.

El estudio en Mozambique fue llevado a cabo en niños asintomáticos y sintomáticos en la provincia de Zambézia. La elección de esta región estuvo basada en criterios de accesibilidad y logística, así como en el hecho de que en esta zona del país no hay datos previos publicados sobre la epidemiología de los protistas enteroparásitos investigados en este trabajo.

Finalmente, el trabajo incluye la distribución, recogida y análisis de encuestas epidemiológicas entre todos los niños participantes en el proyecto con objeto de determinar factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos potencialmente asociados con una mayor probabilidad de contraer infecciones por los patógenos aquí considerados.

### **3.2. Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos involucrados en este trabajo, incluyendo muestreos, técnicas de diagnóstico y caracterización molecular, uso de formularios de consentimiento informado, cuestionarios epidemiológicos y documentación complementaria, han sido aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del ISCIII (Madrid, España) con el número de referencia CEI PI 17\_2017-v3 (estudio en Leganés y Mozambique) y el Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS - Comité Nacional de Bioética para la Salud) del Gobierno de Mozambique (estudio en Mozambique) con el número de referencia 52/CNBS/2017.

El trabajo cumple la normativa legal respecto al tratamiento confidencial y protección de los datos personales de todos los participantes en el proyecto, conforme a lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales (BOE de 6 de diciembre 2018).

En España, la dirección de cada centro educativo participante en el estudio recibió un informe detallado de los resultados generales obtenidos, incluyendo la prevalencia de cada especie parasitaria investigada por sexo y grupo etario. Este informe fue enviado vía correo electrónico entre 2 y 4 semanas después de la conclusión del muestreo. Los padres o tutores legales de niños con un resultado positivo a alguna especie parasitaria relevante en las pruebas diagnósticas realizadas fueron contactados personalmente vía telefónica o por correo electrónico para comprobar si el niño presentaba algún tipo de sintomatología

compatible con la infección. En caso afirmativo se recomendó la visita a su médico pediatra de atención primaria para su posterior evaluación y posible tratamiento.

En Mozambique ni los centros educativos ni los padres o tutores legales de los niños participantes en el estudio fueron informados de los resultados obtenidos debido al desfase temporal (hasta seis meses) entre la recogida de la muestra y el diagnóstico final.

### 3.3. Estudio en España

#### 3.3.1. Contexto geopolítico y descripción del área de estudio

España (extensión: 505.370 km<sup>2</sup>; población 2017: 46,5 millones de habitantes) es un país transcontinental que se extiende por la mayor parte de la península Ibérica entre la latitud N40° 27' y la longitud O3° 44'. El país está administrativamente dividido en diecisiete comunidades autónomas, conformadas a su vez por cincuenta provincias y las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla en el Norte de África. El clima predominante es el mediterráneo en sus dos variantes (continental y litoral), siendo enero el mes más frío (temperatura media 2018: 8 °C) y agosto el más cálido (temperatura media 2018: 26 °C) ([Agencia Estatal de Meteorología, 2018](#)). La población en España es predominantemente urbana (~80%) y las principales fuentes económicas del país proceden de los sectores de servicios (73%) e industria (18%) ([Instituto Nacional de Estadística, 2017](#)). En 2017 la cifra del producto interior bruto (PIB) de España era de 1.314.314 M.USD, siendo la economía número 14 en el ranking de los 192 países que publicaron este dato ([Organización de las Naciones Unidas, 2019](#)). El PIB per cápita de España en ese mismo año fue de 24.970 € ([Instituto Nacional de Estadística, 2017](#)).

El municipio de Leganés (extensión: 43 km<sup>2</sup>; población 2017: 187.720 habitantes) se encuentra dentro del área metropolitana de Madrid y está situado a once kilómetros al sudoeste de la capital entre la latitud N40° 19' 38" y la longitud O3° 45' 49". El clima predominante es el mediterráneo continental, siendo enero el mes más frío (temperatura media 2018: 5 °C) y julio el más cálido (temperatura media 2018: 24 °C) ([Agencia Estatal de Meteorología, 2018](#)). Los niños en el grupo de edad de 3–14 años representan el 12% de la población total, siendo la relación hombre/mujer de 1,06. En 2017, el 14% de la población era inmigrante, siendo los colectivos más representados los procedentes de Colombia (13%), Marruecos (13%) y Nigeria (1%). El porcentaje de viviendas sin saneamiento (servicio o aseo) en Leganés era del 0,9%, ligeramente inferior a la media autonómica (0,9%) o nacional (1%) ([Instituto Nacional de Estadística, 2017](#)). En 2017 el PIB per cápita de Leganés era de 25.045 €

(CAM: 33.824 €). Para ese mismo año la renta disponible bruta per cápita en el municipio era de 15.000 € (CAM: 19.312 €) (Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid, 2019). En Leganés, hay una gran implantación de centros de educación infantil, primaria y secundaria de gestión pública ( $n = 40$ ) frente a centros gestionados de forma concertada ( $n = 5$ ) o privada ( $n = 3$ ) (Ayuntamiento de Leganés, 2017). El porcentaje de población sin estudios en el municipio (17%) es comparativamente superior al de la CAM (12%) e incluso mayor que el de la media nacional (15%) (Instituto Nacional de Estadística, 2017).

### 3.3.2. Reclutamiento de centros educativos en Leganés

Durante el último cuatrimestre de 2017 se concertaron entrevistas presenciales preliminares con los directores de colegios de educación infantil, primaria y secundaria públicos, concertados y privados del municipio de Leganés para informar de los objetivos y procedimientos del estudio y solicitar la colaboración del centro. Siguiendo un criterio de representatividad geográfica, se priorizaron los colegios con un mayor número de alumnos inscritos. En total se obtuvo el consentimiento de participación de 12 colegios (Figura 7).



**Figura 7.** Vista aérea del municipio de Leganés (Madrid, España). Se indica la localización exacta de los centros de educación infantil, primaria y secundaria muestreados en el presente estudio. Fuente: Google Maps.

Tras la aceptación formal de participación, se procedió a la elaboración de un calendario de muestreo consensuado con la dirección de cada centro participante que constaba de 5 etapas secuenciales (Figura 8):

1. Etapa 1: distribución de una circular a todos los padres/tutores legales de niños con edades comprendidas entre 4–14 años incluyendo i) información resumida sobre el estudio y sus objetivos, ii) convocatoria a una charla informativa en las dependencias del centro educativo y iii) volante autorizando la participación del alumno/a en el estudio, para ser entregado al profesor.



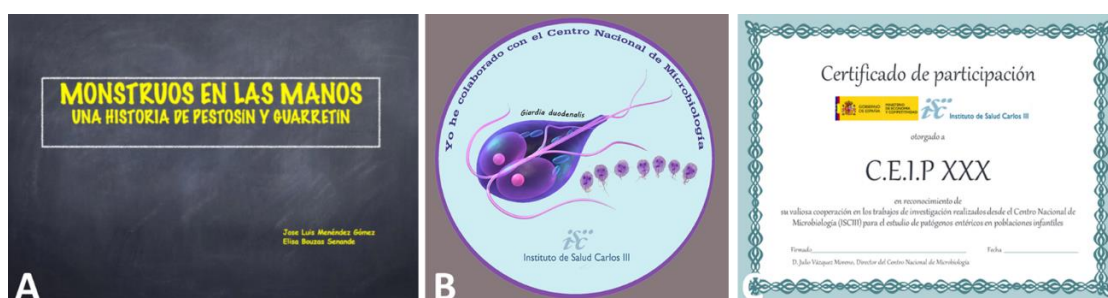
**Figura 8.** Calendario habitual para la campaña de muestreo en cada centro educativo participante en este estudio en el municipio de Leganés, Madrid, España.

2. Etapa 2: impartición de charlas informativas dirigidas a los padres/tutores legales, alumnos y personal docente de cada centro interesados en participar en el estudio (Figura 9A). En dichas charlas se explicó de forma pormenorizada la justificación del trabajo, los objetivos planteados, los procedimientos implicados, los resultados esperados y la forma de comunicar éstos. También se atendieron y resolvieron todas las preguntas y dudas que pudieran surgir.



**Figura 9.** Campaña de muestreo en el municipio de Leganés, Madrid, España. (A) Charla informativa con los tutores legales de los niños participantes en el estudio. (B) Recogida de muestras de heces entre los niños participantes en el estudio. Fuente: David Carmena.

3. Etapa 3: distribución de kits de muestreo identificados con numeración correlativa entre todos los niños autorizados por sus padres/tutores legales a participar de forma voluntaria en el estudio. Esta tarea fue llevada a cabo por el personal docente de cada centro. Cada kit de muestreo contenía:
  - a. Un frasco estéril de polipropileno de 30 mL con espátula para la recogida de heces.
  - b. Una hoja informativa con el resumen del proyecto y el contacto del investigador principal.
  - c. Una hoja informativa especialmente adaptada para niños.
  - d. Un formulario de consentimiento informado para ser firmado por los padres o tutores legales del niño participante en el estudio.
  - e. Una encuesta epidemiológica para recabar datos sobre variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas potencialmente asociadas a un mayor riesgo de infección por las especies de protistas entéricos investigadas (ver sección 3.3.3.).
  - f. Instrucciones para recoger la muestra de heces de forma rápida y segura.
  - g. En agradecimiento a la colaboración prestada, se entregó a cada niño participante un cuento ilustrado para promover los hábitos higiénicos personales (lavado de manos) y un pin conmemorativo (Figura 10A y 10B). Cada centro participante recibió además un diploma acreditativo (Figura 10C).



**Figura 10.** Material complementario entregado en cada kit de muestreo a los niños y a los centros participantes en el municipio de Leganés, Madrid, España. (A) Cuento ilustrado. Fuente: José Luis Menéndez Gómez y Elisa Bouzas Senande. (B) Pin conmemorativo. Fuente: Pamela C. Köster. (C) Diploma acreditando la participación del centro. Fuente: David Carmena.

4. Etapa 4: obtención de muestras de heces en el domicilio particular de cada niño participante en el estudio por parte de los padres o tutores legales, quienes además cumplimentaron la documentación requerida (formulario de consentimiento

informado y encuesta epidemiológica). Las muestras de heces fueron almacenadas a 4 °C hasta su envío al colegio en el siguiente día lectivo hábil.

5. Etapa 5: en coordinación con el personal docente, recogida de muestras fecales y documentación en las instalaciones del centro educativo o en su proximidad (Figura 9B). Esta operación se realizó durante dos días consecutivos para facilitar la participación de aquellos niños que no pudieron llevar su muestra el día anterior y así maximizar el número de muestras disponibles para el estudio. Durante la recepción del material se comprobó, en la medida de lo posible, que toda la documentación requerida estaba adecuadamente cumplimentada. Las muestras fueron transportadas al LRIP del CNM en cajas isotérmicas de poliestireno refrigeradas el mismo día de su recogida y mantenidas sin agentes preservantes a 4 °C ( $\leq 4$  días) o  $-20$  °C ( $> 4$  días) hasta su posterior procesamiento y análisis (ver sección 3.5.).

La campaña de muestreo en el municipio de Leganés (Madrid, España) fue llevada a cabo entre el mes de noviembre de 2017 y el mes de junio de 2018.

### 3.3.3. Encuesta epidemiológica

La encuesta epidemiológica utilizada en este estudio fue específicamente diseñada con la colaboración de la Dra. Sooria Balasegaram (*Public Health England*, Reino Unido) y la Dra. Lucia Reh (*European Centre for Disease Prevention and Control*, Suecia). Tras una sección inicial para constatar la identidad, dirección, lugar de nacimiento, tiempo de residencia en España y contacto (teléfono o correo electrónico) del padre, madre o tutor legal responsable de completar la encuesta, se solicitaron datos sociodemográficos (sexo, edad, número de hermanos) y clínicos (presencia/ausencia de diarrea en los 7 días previos al muestreo) del niño/a participante. A continuación, se recabó información epidemiológica referente al contacto con personas consideradas de riesgo (niños menores de 3 años asistiendo a guarderías, familiares o compañeros de clase con episodios conocidos de diarrea), factores ambientales (viajes al extranjero en los últimos 6 meses, contacto habitual con perros y gatos domésticos, tipo de agua de bebida habitual y ocasional, práctica de deportes acuáticos) y hábitos de higiene (frecuencia de lavado de manos antes de comer, frecuencia de lavado de frutas y verduras frescas). La información obtenida en cada encuesta epidemiológica fue trasladada a una base de datos en Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y al programa de análisis epidemiológico y estadístico de datos cuantitativos EpiData versión 4.2.0 (EpiData Association, Odense, Dinamarca). La plantilla de este documento se muestra en el Anexo X.

Todos los niños que declararon episodios de diarrea en los 7 días previos al muestreo fueron excluidos del estudio, aunque sus muestras de heces fueron procesadas, analizadas e informadas de idéntica forma a las obtenidas de niños asintomáticos.

### 3.4. Estudio en Mozambique

#### 3.4.1. Contexto geopolítico y descripción del área de estudio

Mozambique (extensión: 799.380 km<sup>2</sup>; población 2017: 27 millones de habitantes) es un país de clima tropical y subtropical, ubicado en la costa oriental del sur de África entre la latitud S18° 15' y la longitud E35° 00'. El país está administrativamente dividido en 11 provincias con marcadas desigualdades socioeconómicas en su población, principalmente en las zonas rurales y las provincias centrales y norteñas ([Instituto Nacional de Estatística de Moçambique, 2017](#)). En 2017 la cifra del PIB de Mozambique fue de 12.651 M.USD, siendo la economía número 120 en el ranking de los 192 países que publicaron este dato ([Organización de las Naciones Unidas, 2019](#)). El PIB per cápita de Mozambique en ese mismo año fue de 461 USD ([Instituto Nacional de Estatística de Moçambique, 2017](#)). Se estima que el 46% de la población vive bajo el umbral de pobreza y que el 74% practica la agricultura de subsistencia ([Central Intelligence Agency, 2015](#)).

La provincia de Zambézia (extensión: 105.008 km<sup>2</sup>; población 2017: 5,1 millones de habitantes) está ubicada en la región central del país a unos 1.600 kilómetros al norte de la capital (Maputo), entre la latitud S17° 0' 0" y la longitud E37° 0' 0" ([Instituto Nacional de Estatística de Moçambique, 2017](#)). El clima de Zambézia es tropical y húmedo, con una estación lluviosa y cálida de noviembre a marzo y otra seca y fresca de mayo a octubre. Las temperaturas más altas (38–40 °C) se dan entre diciembre y febrero, y las más frescas (18–20 °C) en junio y julio ([dos Muchangos, 1999](#)). La provincia se divide en dos zonas que difieren ecológica, climática y orográficamente: i) "Alta Zambézia" ocupa la parte norte y no costera de la provincia, abarcando áreas elevadas de clima templado, mayor pluviosidad y temperaturas medias anuales de 22–24 °C en la meseta y de 18 °C en zonas más montañosas, y ii) "Baixa Zambézia" ocupa la parte sur de la provincia, de menor elevación y cercana al litoral. Esta región tiene un clima muy cálido y húmedo con temperaturas medias anuales entre 24–26 °C ([Lorenzetti, 2013](#)).

En términos demográficos, Zambézia es la segunda provincia más poblada de Mozambique. Sus habitantes, distribuidos en 22 distritos, viven en su mayoría (82%) en áreas rurales. La población infantil de 0–14 años representa la mitad (50%) de la población total,

siendo la relación hombre/mujer de 0,92. La principal actividad económica es la agricultura de subsistencia familiar, seguida por la pesca y la minería. Zambézia es una de las provincias de Mozambique menos desarrolladas y con mayores índices de pobreza ([Instituto Nacional de Estadística, 2017](#)). El tipo de vivienda en áreas rurales difiere significativamente de las de áreas urbanas. La construcción tipo es la cabaña (83%), con piso de tierra, techumbre de paja y paredes de adobe reforzado con palos de madera ([Figura 11](#)).



**Figura 11.** Viviendas características de áreas rurales de la provincia de Zambézia, Mozambique. (A y B) Viviendas construidas con ladrillos de adobe y cubierta vegetal de paja y hierba. (C) Vivienda construida con mampostería de barro y madera y techumbre de placa de zinc. Fuente: Aly Salimo Muadica (fotografías tomadas durante el trabajo de campo).

Por otra parte, solamente el 8% de la población de Zambézia tiene acceso a agua corriente. El resto obtiene el agua de consumo (no tratada) que necesita a partir de reservorios superficiales (ríos, lagos), agua de lluvia y pozos excavados con o sin protección ([Figura 12A y 12B](#)).

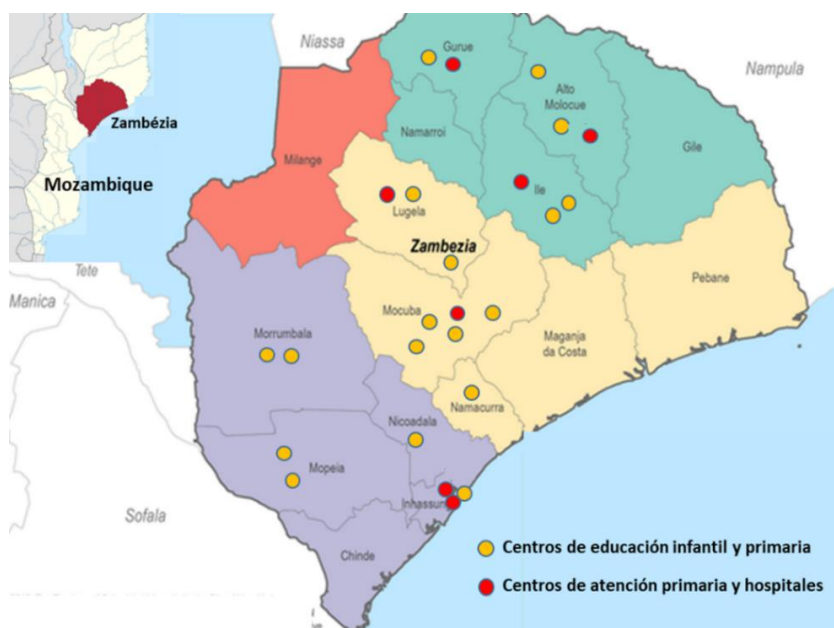


**Figura 12.** Pozos para la extracción de agua de consumo humano característicos de áreas rurales de la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Pozo protegido con bomba de extracción manual. (B) Pozo desprotegido directamente excavado en el suelo. Fuente: Aly Salimo Muadica (fotografías tomadas durante el trabajo de campo).

La escasez o, más comúnmente, inexistencia de infraestructuras de saneamiento hace que más de la mitad (65,2%) de las personas censadas en la provincia no dispongan de letrinas y defecuen de forma habitual en espacios abiertos ([Instituto Nacional de Estadística, 2017](#)).

### 3.4.2. Reclutamiento de centros educativos en Zambézia

Durante los meses de octubre y diciembre de 2017 se concertaron entrevistas presenciales con los líderes comunitarios locales y docentes de colegios de educación infantil, primaria y secundaria de la provincia para informar de los objetivos y procedimientos del estudio y solicitar la colaboración del centro visitado. Debido a las dificultades de accesibilidad y a los limitados recursos disponibles, se priorizaron los colegios que requerían una logística más sencilla. Un total de 17 colegios públicos y una guardería de gestión privada distribuidos en 10 de los 22 distritos de la provincia consintieron en participar en el estudio ([Figura 13](#)).



**Figura 13.** Mapa de la provincia de Zambézia (Mozambique) mostrando la localización geográfica de los centros educativos y de atención médica muestreados en el presente estudio.

Tras la aceptación formal de participación, se procedió a la elaboración de un calendario de muestreo inspirado en el llevado a cabo en Leganés (España), pero simplificado para adaptarlo a las dificultades y limitaciones intrínsecas asociadas al trabajo de campo en un país de renta baja. Este calendario estaba basado en 3 etapas secuenciales:

1. Etapa 1: impartición de charlas informativas dirigidas a los padres/tutores legales y personal docente de cada centro interesados en participar en el estudio ([Figura 14A y 14B](#)). En dichas charlas se explicó de forma pormenorizada la justificación del trabajo,

los objetivos planteados y los procedimientos implicados. También se atendieron y resolvieron todas las preguntas y dudas que pudieran surgir.



**Figura 14.** Campaña de muestreo en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Charla informativa con los tutores legales de los niños participantes en el estudio. (B) Charla informativa con el personal docente de una de las escuelas rurales muestreadas en el estudio. Fuente: Aly Salimo Muadica (fotografías tomadas durante el trabajo de campo).

2. Etapa 2: impartición, en el mismo día, de charlas explicativas a los niños de 3–14 años de los colegios visitados y distribución entre grupos aleatoriamente seleccionados de kits de muestreo (Figura 15A y 15B). Cada kit contenía un frasco estéril de polipropileno de 30 mL con espátula para la recogida de heces y un formulario de consentimiento informado para ser firmado por los padres o tutores legales del niño participante en el estudio.



**Figura 15.** Campaña de muestreo en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Charla informativa con los niños de una de las escuelas muestreadas en el estudio. (B) Distribución del material para la recogida de muestras de heces entre los niños participantes en el estudio. Fuente: Aly Salimo Muadica (fotografías tomadas durante el trabajo de campo).

3. Etapa 3: recogida, al día siguiente, de las muestras de heces y los consentimientos informados cumplimentados. Cada niño participante fue individualmente

entrevistado para completar el cuestionario epidemiológico correspondiente (ver sección 3.4.4.). En ese momento se procedió a identificar con un código numérico correlativo todo el material entregado. Las muestras de heces fueron transportadas hasta el centro de salud colaborador más cercano para su conservación a 4 °C hasta su posterior procesamiento (ver sección 3.4.5.).

### 3.4.3. Reclutamiento de centros de atención médica en Zambézia

De forma paralela a los muestreos realizados en población pediátrica escolar, se obtuvieron muestras de heces de niños con síntomas gastrointestinales (principalmente diarrea y dolor abdominal) del mismo rango de edad (3–14 años) atendidos como pacientes ambulatorios en centros médicos. Para ello, se solicitó mediante contacto previo por carta la colaboración de centros de atención médica. Un total de 6 centros de salud y un centro hospitalario asistencial distribuidos en 6 distritos de la provincia de Zambézia accedieron a cooperar (Figura 13). Las muestras de heces obtenidas provinieron de procedimientos de diagnóstico coproparasitario rutinario en los laboratorios clínicos o microbiológicos de dichos centros. La obtención de consentimientos informados y la realización de encuestas epidemiológicas (ver sección 3.4.4.) fueron llevadas a cabo de forma presencial en entrevistas individuales con los niños así reclutados y sus padres o tutores legales durante su estancia en el centro médico. Las muestras de heces fueron conservadas a 4 °C hasta su posterior procesamiento (ver sección 3.4.5.).

### 3.4.4. Encuesta epidemiológica

La encuesta epidemiológica utilizada en Mozambique era una versión en portugués de la utilizada en España adaptada a las condiciones epidemiológicas particulares del país. Las principales diferencias radicaban en la inclusión de datos específicos del encuestado como el ámbito de procedencia (rural o urbana), distrito y barriada, el tipo de material (ladrillo, adobe, madera) de la vivienda, el contacto directo con animales de producción, la fuente de agua potable utilizada (reservorios naturales de superficie, pozos, de red), la disponibilidad o no de tratamiento (hervido, cloración) de la misma y el acceso a una letrina. En el caso de niños sintomáticos atendidos en centros de atención médica también se consignaron las manifestaciones clínicas presentes en el momento del diagnóstico. La información obtenida en cada encuesta epidemiológica fue procesada usando el mismo procedimiento descrito en la sección 3.3.3. La plantilla de este documento se muestra en el Anexo XI.

### 3.4.5. Preservación de las muestras de heces

Una alícuota (~0,5 g) de cada muestra fecal recogida tanto en niños asintomáticos como en niños sintomáticos en la provincia de Zambézia fue transferida al dispositivo comercial de recogida, concentración y preservación de heces Real Mini-Sistem (15 mL) con TOTAL-FIX® (Durviz, Valencia, España) compatible con el uso de técnicas moleculares (Figura 16A) y mantenidas a temperatura ambiente sin exposición solar (Figura 16B) hasta su envío (Figura 16C) al LRIP del CNM en Majadahonda (España) para su posterior procesamiento y análisis.



**Figura 16.** Recogida de muestras de heces en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Dispositivo Real Mini-Sistem con Total-Fix® (Durviz). (B). Almacenamiento de las muestras fecales recogidas en los dispositivos. (C) Empaquetado para su transporte. Fuente: Aly Salimo Muadica (fotografías tomadas durante el trabajo de campo).

### 3.5. Extracción y purificación de ADN a partir de muestras fecales

Para la extracción y purificación de ADN genómico a partir de las muestras fecales obtenidas en las campañas de muestreo llevadas a cabo en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique) se utilizó el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QiAGEN, Hilden, Alemania). Se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante con modificaciones menores. De forma resumida, se transfirió una alícuota (~200 mg) de heces frescas o recién descongeladas (Leganés) o concentradas (Zambézia) a un tubo Eppendorf de 2 mL al que se añadió 1 mL de tampón Inhibitex. Tras homogeneizar vigorosamente en un agitador vórtex durante 20–30 s, el tubo fue preincubado a 95 °C durante 10 min. Este paso previo tenía como objetivo debilitar la pared de quistes/ooquistes/esporas y facilitar la lisis química posterior. Tras un paso de centrifugación a 16.200×g durante 3 min, se transfirieron a un tubo limpio y en el orden indicado 15 µL de proteinasa K, 350 µL de sobrenadante de la muestra y 200 µL de tampón AL. La mezcla fue brevemente homogeneizada e incubada a 70 °C durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 µL de etanol absoluto (≥99.8%) y la mezcla fue

homogenizada. Se transfirieron 600 µL del lisado así obtenido a la columna de sílica suministrada por el fabricante, que fue centrifugada a 16.200×g durante 3 min. En un primer paso de lavado, la columna fue transferida a un tubo colector limpio, se añadieron 500 µL de tampón AW1 y se centrifugó a 16.200×g durante 1 min. En un segundo paso de lavado se repitió el proceso anterior, pero usando en esta ocasión tampón AW2 y un paso de centrifugación a 16.200×g durante 3 min. La columna conteniendo el ADN genómico fue colocada en un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio y se volvió a centrifugar a 16.200×g durante 3 min para eliminar cualquier resto del tampón de lavado. Por último, el ADN retenido en la columna fue eluído en 200 µL de agua grado biología molecular dispensados directamente sobre la columna tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente y una centrifugación a 16.200×g durante 1 min. Se incluyeron de forma regular controles de extracción (sin adición de sobrenadante fecal) para comprobar la ausencia de contaminación por ADN exógeno de todos los reactivos utilizados en el procedimiento.

El protocolo anteriormente indicado fue realizado en todas las muestras fecales usando el sistema de extracción automatizado QIAcube (QIAGEN) en el LRIP del CNM, excepto en el caso del segundo lote de muestras recogidas en Mozambique (ver sección 3.4.3.), que fueron procesadas *in situ* de forma manual siguiendo el mismo método. El ADN genómico obtenido fue almacenado a 4 °C hasta su posterior análisis mediante PCR.

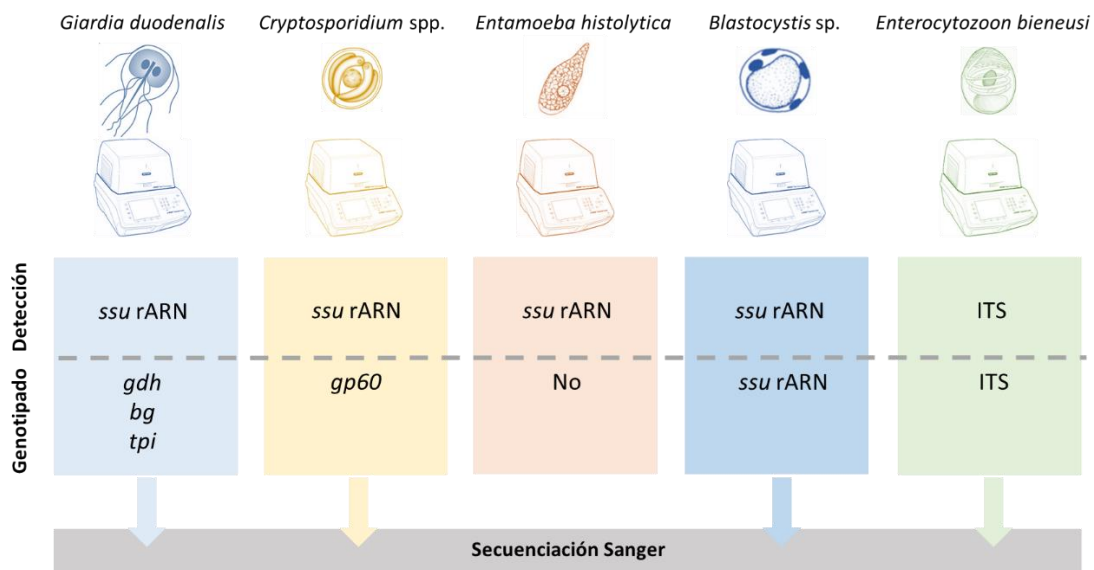
### **3.6. Detección y genotipado de protistas entéricos mediante técnicas moleculares**

Para la detección y caracterización molecular de las especies de protistas entéricos, en este estudio se utilizaron protocolos de PCR convencional directa, semianidada, anidada y de qPCR firmemente establecidos en la literatura y ampliamente utilizados en laboratorios clínicos y de investigación de todo el mundo incluido el LRIP del CNM. En cada caso, la elección del marcador genético adecuado estuvo condicionada por la finalidad de la PCR.

Así, los genes *ssu* rARN e ITS fueron los marcadores de elección en las PCRs de detección de todos los patógenos aquí investigados. Al ser ambos genes multicopia, existe un mayor número de dianas disponibles en la reacción inicial de amplificación, lo que aumenta considerablemente la sensibilidad de estos ensayos. Por este motivo, *ssu* rARN e ITS son frecuentemente utilizados en estudios epidemiológicos de campo implicando un gran número de muestras (Dacal *et al.*, 2020). El principal inconveniente de estos marcadores genéticos es que sus secuencias nucleotídicas están relativamente bien conservadas entre especies evolutivamente cercanas, por lo que pueden generar amplificaciones inespecíficas (falsos positivos). Este problema puede ser resuelto, al menos parcialmente, mediante la

confirmación por secuenciación del producto de amplificación obtenido (Figura 17). Basados en estos marcadores, la sensibilidad y especificidad diagnóstica de las PCRs empleadas en este estudio para la detección de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *E. dispar*, *Blastocystis* sp. y *E. bienewsi* eran superiores al 90% y 95%, respectivamente (de Lucio *et al.*, 2015, 2016b, 2017; Dashti *et al.*, 2019; Paulos *et al.*, 2019).

Para la caracterización molecular de algunas especies de protistas entéricos previamente confirmadas por *ssu* rARN existen a su vez marcadores genéticos que muestran una variabilidad en su secuencia nucleotídica lo suficientemente amplia como para discriminar entre distintos genotipos y subgenotipos. Es el caso de los genes codificantes de las proteínas glutamato deshidrogenasa (*gdh*), beta-giardina (*bg*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*) en *G. duodenalis*, y *gp60* en *Cryptosporidium* spp. (Figura 17). El principal inconveniente de este tipo de marcadores es que suelen ser genes de copia única, por lo que la sensibilidad de las PCRs que los utilizan no es elevada. Este hecho explica que un porcentaje considerable de muestras positivas por *ssu*-PCR o ITS-PCR no se puedan amplificar en las PCRs de genotipado correspondientes (Dacal *et al.*, 2020).



**Figura 17.** Esquema resumiendo los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio para la detección y caracterización molecular de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis* sp. y *Enterocytozoon bienewsi*. Información adicional disponible en el Anexo XII.

### 3.6.1. Detección y genotipado de *Giardia duodenalis*

Para la detección inicial de ADN de *G. duodenalis* se utilizó un protocolo de qPCR que amplifica un fragmento de 62 pares de bases (pb) del marcador molecular *ssu* rARN del parásito (Verweij *et al.*, 2003b). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L

conteniendo 3  $\mu\text{L}$  de ADN molde, la pareja de cebadores Gd-80F/Gd-127R en concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ , una sonda de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> de doble marcaje (incluyendo el fluorocromo FAM<sup>™</sup> en el extremo 5' y el apagador BHQ1<sup>™</sup> en el extremo 3') en concentración de 0,4  $\mu\text{M}$  (Anexo XII), y 12,5  $\mu\text{L}$  del tampón TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, EEUU). El protocolo de amplificación consistía en un paso previo de 2 min a 55 °C y 15 min a 95 °C seguido de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La señal de fluorescencia (FAM<sup>™</sup>: 510 nm) fue determinada al final de la etapa de hibridación en cada ciclo de amplificación.

Todas las muestras con un resultado positivo a *G. duodenalis* en qPCR fueron posteriormente reanalizadas adoptando una estrategia de tipificación multilocus de secuencias (en inglés MLST) usando como marcadores moleculares genes constitutivos codificantes de 2 enzimas metabólicas (*gdh* y *tpi*) y una proteína estructural (*bg*) del parásito (Figura 17). *Giardia duodenalis* usa *gdh*, junto con el enzima alanina aminotransferasa, para disipar el exceso de poder reductor y mantener el equilibrio intracelular de NAD(P)-NAD(P)H a través de la conversión de piruvato en alanina (Yee y Dennis *et al.*, 1993). Por su parte, *tpi* está implicada en la glucólisis catalizando la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, reacción que tiene lugar a través de un intermediario enediol (Mowatt *et al.*, 1994). Finalmente, *bg* es una proteína involucrada en la organización microtubular del citoesqueleto del trofozoíto del parásito. El hecho de no tener homología conocida con ninguna otra proteína asociada a microtúbulos sugiere que *bg* es específica de *G. duodenalis* (Marshall y Holberton, 1993).

En el caso del marcador genético *gdh* se utilizó un protocolo de PCR semianidada específicamente diseñado para la amplificación parcial de un fragmento de 432 pb del gen (Read *et al.*, 2004). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 5  $\mu\text{L}$  de ADN molde y las parejas de cebadores GDHeF/GDHiR (reacción primaria) y GDHiF/GDHiR (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  (Anexo XII). Ambos protocolos de amplificación consistieron en un paso inicial a 95 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s (desnaturalización), 55 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 7 min.

En el caso del marcador genético *bg* se utilizó un protocolo de PCR anidada específicamente diseñado para la amplificación parcial de un fragmento de 511 pb del gen (Lalle *et al.*, 2005). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 3  $\mu\text{L}$  de ADN molde y las parejas de cebadores G7\_F/G759\_R (reacción primaria) y G99\_F/G609\_R (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,4  $\mu\text{M}$  (Anexo XII). El protocolo de

amplificación de la primera PCR consistía en un paso inicial a 95 °C durante 7 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s (desnaturalización), 65 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 7 min. El protocolo de amplificación de la segunda PCR era idéntico al descrito anteriormente con la única diferencia de que la temperatura de hibridación era de 55 °C.

En el caso del marcador genético *tpi* se utilizó un protocolo de PCR anidada específicamente diseñado para la amplificación parcial de un fragmento de 530 pb del gen (Sulaiman *et al.*, 2003b). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 2 µL de ADN molde en la primera PCR y 2,5 µL en la segunda PCR y las parejas de cebadores AL3543/AL3546 (reacción primaria) y AL3544/AL3545 (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,2 µM (Anexo XII). Ambos protocolos de amplificación consistieron en un paso inicial a 94 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 45 s (desnaturalización), 50 °C durante 45 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

### 3.6.2. Detección y genotipado de *Cryptosporidium* spp.

Para la detección inicial de ADN de *Cryptosporidium* spp. se utilizó un protocolo de PCR anidada que amplificaba un fragmento de 587 pb del marcador molecular *ssu* rARN (Tiangtip y Jongwutiwes, 2002). La secuenciación Sanger de los amplicones obtenidos en esta PCR permite identificar la especie, pero no la familia genotípica, del parásito. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 3 µL de ADN molde y las parejas de cebadores CR-P1/CR-P2 (reacción primaria) y CR-P3/CPB-DIAGR (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,3 µM (Anexo XII). Ambos protocolos de amplificación consistieron en un paso inicial a 94 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 40 s (desnaturalización), 50 °C durante 40 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Para la caracterización molecular de las muestras identificadas como *C. hominis* o *C. parvum* mediante *ssu*-PCR y secuenciación Sanger, se utilizó un protocolo de PCR anidada que amplificaba un fragmento de 870 pb del marcador molecular *gp60* del parásito (Feltus *et al.*, 2006). Las particularidades de este locus han sido ya examinadas en detalle en la sección 1.7.1. y el Anexo I. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 2 µL de ADN molde en la primera PCR y 3 µL en la segunda PCR y las parejas de cebadores AL-3531/AL-3535 (reacción primaria) y AL-3532/AL-3534 (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,3 µM (Anexo XII). El protocolo de amplificación de la primera PCR

consistía en un paso inicial a 94 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 45 s (desnaturalización), 59 °C durante 45 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 10 min. El protocolo de amplificación de la segunda PCR era idéntico al descrito anteriormente con la única diferencia de que la temperatura de hibridación era de 50 °C.

Para la caracterización molecular de las muestras identificadas como *C. vistorum* mediante *ssu*-PCR y secuenciación Sanger, se utilizó un protocolo de PCR anidada que amplificaba un fragmento de 950 pb del marcador molecular *gp60* del parásito (Stensvold *et al.*, 2015). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo 2 µL de ADN molde en la primera PCR y 1 µL en la segunda PCR y las parejas de cebadores CviatF2/CviatR5 (reacción primaria) y CviatF3/CviatR8 (reacción secundaria) en concentración de 0,25 µM y 5 µM, respectivamente (Anexo XII). Ambos protocolos de amplificación consistieron en un paso inicial a 95 °C durante 4 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s (desnaturalización), 58 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 7 min.

### 3.6.3. Diagnóstico diferencial de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Para la detección y el diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* se utilizó un protocolo de qPCR que amplificaba un fragmento de 172 pb del marcador molecular *ssu* rARN del parásito (Verweij *et al.*, 2003a; Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2010). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo 3 µL de ADN molde, la pareja de cebadores Ehd-239F/Ehd-88R (común a ambas especies) en concentración de 0,5 µM, las sonda de hidrólisis TaqMan® de doble marcaje FAM<sup>TM</sup>/MGB<sup>TM</sup> (*E. histolytica*) y VIC<sup>TM</sup>/MGB<sup>TM</sup> (*E. dispar*) ambas en concentración de 0,2 µM (Anexo XII), y 12,5 µL del tampón TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). El protocolo de amplificación consistía en un paso previo de 2 min a 55 °C y 15 min a 95 °C seguido de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Las señales de fluorescencia (FAM<sup>TM</sup>: 510 nm y VIC<sup>TM</sup>: 580 nm) fueron determinadas al final de la etapa de hibridación en cada ciclo de amplificación. Esta técnica no fue usada en muestras procedentes de Leganés (España) al considerarse de forma inicial que *E. histolytica* no es una especie relevante en población pediátrica asintomática en este país.

### 3.6.4. Detección y genotipado de *Blastocystis* sp.

Para la detección inicial de ADN de *Blastocystis* sp. se utilizó un protocolo de PCR directa que amplificaba un fragmento de 600 pb del marcador molecular *ssu* rARN (Sciicluna *et al.*, 2006). La secuenciación Sanger de los amplicones obtenidos en esta PCR permite identificar no solo

la especie, sino también el subtipo del parásito siguiendo la nomenclatura propuesta por [Stensvold \*et al.\* \(2007\)](#) y [Stensvold y Clark \(2020\)](#). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 5  $\mu\text{L}$  de ADN molde y la pareja de cebadores pan-*Blastocystis* RD5/BhRDr en concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  ([Anexo XII](#)). El protocolo de amplificación consistió en un paso inicial a 95 °C durante 3 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 59 °C durante 1 min (hibridación) y 72 °C durante 1 min (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 2 min.

#### 3.6.5. Detección y genotipado de *Enterocytozoon bienewisi*

Para la detección inicial de ADN de *E. bienewisi* se utilizó un protocolo de PCR anidada que amplificaba un fragmento de 390 pb incluyendo la región ITS completa y, en sus flancos, secuencias parciales del ARN de las subunidades pequeña y grande del ribosoma ([Buckholt \*et al.\*, 2002](#)). La secuenciación Sanger de los amplicones obtenidos en esta PCR permite identificar no solo la especie, sino también el genotipo del parásito siguiendo la nomenclatura propuesta por [Santín y Fayer \(2009\)](#). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de ADN molde y las parejas de cebadores EBITS3/EBITS4 (reacción primaria) y EBITS1/EBITS2.4 (reacción secundaria) ambas en concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  ([Anexo XII](#)). El protocolo de amplificación de la primera PCR consistía en un paso inicial a 94 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s (desnaturalización), 57 °C durante 30 s (hibridación) y 72 °C durante 40 s (elongación), con una extensión final a 72 °C durante 10 min. El protocolo de amplificación de la segunda PCR era idéntico al descrito anteriormente con las diferencias de que el número de ciclos era de 30 y la temperatura de hibridación de 55 °C.

#### 3.6.6. Reactivos y procedimientos comunes

Todas las muestras analizadas por PCR en el presente estudio fueron ensayadas de forma única (sin duplicados). Todos los protocolos de qPCR anteriormente descritos fueron llevados a cabo en un termociclador Corbett Rotor Gene™ 6000 (QIAGEN).

Todos los protocolos de PCR directa, semianidada y anidada anteriormente descritos fueron llevados a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems). Las reacciones siempre incluyeron 2,5 unidades de ADN polimerasa MyTAQ™ (Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania), y tampón de reacción MyTAQ™ 5× conteniendo deoxinucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) en concentración 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  en concentración 15 mM. El ADN de los amplicones obtenidos en cada ronda de PCR fueron visualizados mediante

electroforesis en geles de agarosa D5 al 2% (Conda, Madrid, Spain) teñidos con la solución intercalante no cancerígena Pronasafe (Conda) en proporción 1:20.000.

En cada ronda de qPCR y PCR convencional se incluyeron un control negativo (agua grado biología molecular) y un control positivo (ADN genómico de muestras confirmadas previamente diagnosticadas y/o molecularmente caracterizadas en el LRIP del CNM). También se incluyó de forma rutinaria pero más espaciada en el tiempo un control de extracción (ver sección 3.5.).

### 3.7. Análisis de secuencias y estudio filogenético

Todos los amplicones del tamaño esperado obtenidos en cada ronda de PCR directa, semianidada o anidada fueron directamente enviados a secuenciar en ambas direcciones (5' y 3') utilizando la pareja de cebadores internos correspondiente ([Anexo XII](#)). Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por electroforesis capilar y marcaje con fluorocromos utilizando la química BigDye® Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del CNM.

Las secuencias 5' y 3' sin refinar obtenidas fueron visualmente inspeccionadas con detenimiento usando el programa libre de análisis de secuencias Chromas Lite versión 2.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). Se prestó especial atención a la presencia de posiciones ambiguas (dobles picos) en el cromatograma indicativos de posibles infecciones mixtas o eventos de recombinación genética, particularmente en *G. duodenalis* ([Morrison et al., 2007](#); [Franzén et al., 2009](#); [Anderson, 2012](#)). Tras ser editadas y validadas, se generaron las correspondientes secuencias consenso. Los amplicones que generaron secuencias de calidad insuficiente pero provenientes de una banda de intensidad razonable en gel fueron resecuenciados al menos una vez. En caso necesario se procedió a la repetición de la PCR y al envío del nuevo amplicón para ser secuenciado.

La herramienta BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, EEUU) fue utilizada para determinar la homología existente entre las secuencias nucleotídicas generadas en el presente estudio y las depositadas previamente en la base de datos del repositorio público GenBank. El programa libre MEGA versión 6 ([Tamura et al., 2013](#)) fue utilizado para alinear simultáneamente las secuencias consenso generadas con las obtenidas en GenBank no solo para identificar especies, genotipos y subgenotipos, sino también para determinar la presencia y frecuencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP), tanto en forma de posiciones ambiguas (dobles picos) como de mutaciones, inserciones o deleciones

en la secuencia nucleotídica. Para este fin, en el caso específico de *Blastocystis* sp. se usó como base de datos de partida el repositorio público *Blastocystis* 18S (<http://pubmlst.org/blastocystis/>).

La historia evolutiva de los genes utilizados en la identificación de especies y genotipos fue inferida a partir de alineamientos de secuencias múltiples usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Este algoritmo se basa en el criterio de mínima evolución, en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas. La longitud de éstas indica la cantidad de cambio evolutivo. Los correspondientes árboles filogenéticos fueron generados usando MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013) con 1.000 repeticiones en la prueba de remuestreo *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas fueron computadas usando el modelo de Kimura con 2 parámetros (Kimura, 1980) y la tasa de variación entre posiciones fue modelada usando una distribución gamma con parámetro de forma = 1. En todos los análisis se incorporaron secuencias de referencia y secuencias apropiadas para fines comparativos obtenidas de GenBank.

### 3.8. Análisis estadístico

La información sociodemográfica, clínica y epidemiológica recabada a partir de las encuestas epidemiológicas realizadas en el municipio de Leganés, España (ver sección 3.3.3.) y la provincia de Zambézia, Mozambique (ver sección 3.4.4.) fue analizada estadísticamente usando el programa Stata versiones 13 y 15 (STATA Corp., College Station, Texas, EEUU). Debido a su complejidad intrínseca, estos análisis fueron conducidos por la Dra. Lucia Reh (*European Centre for Disease Prevention and Control*, Suecia) y por el Dr. Kazim Beebejaun, el Dr. Neville Q. Verlander y la Dra. Sooria Balasegaram (*Public Health England*, Reino Unido) bajo la dirección y supervisión de esta última.

Se calculó la prevalencia de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *E. dispar*, *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* de forma tanto individual como combinada (co-infección) en las poblaciones pediátricas objeto de estudio. *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* sólo fueron investigadas en la población pediátrica proveniente de Mozambique. La prueba de chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher fueron usadas para comparar las prevalencias de estos patógenos en función del sexo y las variables categóricas potencialmente asociadas a una mayor probabilidad de infección, incluyéndose como factor de riesgo la presencia de otra especie de enteroparásito en forma de infección mixta. Se consideró como evidencia de significancia estadística un valor de  $P < 0,05$ .

Para variables continuas, se seleccionó el modelo de mejor ajuste usando la prueba de razón de verosimilitud para funciones lineales, cuadráticas, cúbicas y logarítmicas. También se calcularon los cocientes de probabilidad (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC 95%) mediante análisis univariante y multivariante usando modelos de regresión logística con objeto de investigar la posible asociación entre factores protectores o de riesgo y la infección por cada uno de los patógenos considerados.

El modelo de regresión logística exacta fue utilizado para calcular ORs en variables únicas y evitar divisiones por cero. Aquellos factores con un valor de  $P \leq 0,2$  en el análisis univariante fueron preseleccionados para su posible inclusión en el modelo de regresión logística multivariante. Aquellos factores con valores de  $P$  más bajos fueron finalmente incluidos en el análisis y usados para identificar posibles sesgos (indicados por un cambio  $> 20\%$  en el OR asociado a otras variables) y agrupamientos de valores (*clustering*).

Para investigar la existencia de posibles relaciones de dependencia a nivel escolar y familiar se compararon los resultados obtenidos en diferentes modelos multinivel en los que se consideraba aleatoriamente el efecto de determinadas variables (p.e. “colegio” y “familia” en el muestreo en España, y “distrito” y “barriada” en el muestreo en Mozambique) con los obtenidos en modelos logísticos en los que otras variables eran consideradas como efectos fijos. Si la inclusión de una variable determinada no era significativa (estimada mediante la prueba de razón de verosimilitud), dicha variable era excluida del modelo y una nueva era testada en su lugar. Así, en los análisis multivariantes sólo se indican cocientes de probabilidad ajustados (aOR) para aquellos factores que fueron considerados en el modelo final.



## **4. RESULTADOS**



## 4. Resultados

### 4.1. Muestreo en Leganés, España

La campaña de muestreo en niños asintomáticos del municipio de Leganés (Madrid, España) fue llevado a cabo entre noviembre de 2017 y junio de 2018. De los 12 centros educativos que accedieron a colaborar en este estudio, el 75% (9/12) eran de gestión pública, el 17% (2/12) de gestión concertada y el 8% (1/12) de gestión privada (Tabla 7). De ellos, el 67% (8/12) incluían el tramo de educación infantil y primaria (3–12 años), el 25% (3/12) el tramo de educación infantil, primaria y secundaria obligatoria (3–16 años) y el 8% (1/12) el tramo de educación primaria y secundaria obligatoria (6–12 años). Los resultados presentados en esta sección han sido publicados en la referencia [Reh et al. \(2019\)](#).

**Tabla 7.** Datos de participación en los centros educativos muestreados en el municipio de Leganés, Madrid, España.

Colegio	Tipo de gestión	Estudiantes totales (n)	Muestras recogidas (n)	Muestras válidas <sup>a</sup> (n)	Participación (%)
1	Concertado	990	139	121	12
2	Público	440	126	117	27
3	Público	850	238	216	25
4	Público	400	82	64	16
5	Público	450	148	128	28
6	Público	485	132	119	24
7	Público	315	88	39	12
8	Público	446	68	62	14
9	Concertado	353	148	128	36
10	Público	561	148	115	26
11	Público	395	214	185	47
12	Privado	180	72	62	34
Total		6.089	1.603	1.356	22

<sup>a</sup> Para el estudio de análisis de riesgos.

#### 4.1.1. Participación en centros educativos en Leganés

El censo de alumnos en los 12 centros educativos muestreados era de 6.089 (rango por centro: 180–990 alumnos; media: 486 alumnos). De los 1.603 kits recogidos durante la campaña de muestreo se desestimaron un total de 245 (Tabla 7). Los motivos de exclusión más frecuentes fueron la falta de alguno de los 3 elementos imprescindibles para el estudio (consentimiento informado, muestra de heces, encuesta epidemiológica), la incorrecta cumplimentación de la documentación requerida y la inclusión de muestras de heces de origen humano (normalmente de hermanos y familiares cercanos) o animal (normalmente mascotas) ajenas a la finalidad del

estudio. Los niños que declararon episodios de diarrea en los 7 días previos al muestreo fueron excluidos del estudio de análisis de riesgos, pero no del estudio molecular para la identificación de protistas entéricos. Finalmente se reclutaron un total de 1.356 niños aparentemente sanos sin manifestaciones clínicas relacionadas con posibles trastornos gastrointestinales (Tabla 7), lo que supone casi uno de cada cuatro alumnos censados (participación por centro: 12–47%; media: 22%).

#### 4.1.2. Datos sociodemográficos de la población escolar muestreada en Leganés

La distribución por grupo etario y sexo de los niños participantes en la campaña de muestreo en Leganés se muestran en la Tabla 8. El rango de edad de los niños reclutados era de 4–14 años, con una mediana de 7 años. La proporción de niños/niñas era de 1,2. Los niños muestreados tenían, de promedio, un hermano en su núcleo familiar.

**Tabla 8.** Principales datos sociodemográficos por centro educativo de los niños participantes en la campaña de muestreo realizada en el municipio de Leganés, Madrid, España.

Colegio	Total (n)	4–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	121	60	50	50	41	11	9	68	56	53	44
2	117	48	41	52	44	17	15	61	52	56	48
3	216	54	25	112	52	50	23	126	58	90	42
4	64	34	53	20	31	10	16	31	48	33	52
5	128	58	45	58	45	12	9	67	52	61	48
6	119	43	36	64	54	12	10	67	56	52	44
7	39	16	41	20	51	3	8	19	49	20	51
8	62	25	40	32	52	5	8	28	45	34	55
9	128	69	54	59	46	0	0	67	52	61	48
10	115	51	44	52	45	12	10	70	61	45	39
11	185	67	36	94	51	24	13	95	51	90	49
12	62	12	19	32	52	18	29	40	65	22	35
Total	1.356	537	40	645	48	174	13	739	55	617	45

La distribución por país de origen, grupo etario y sexo de los niños nacidos fuera de España que participaron en el estudio se muestran en la Tabla 9. Este colectivo representó el 8% (107/1.356) de los niños reclutados, de los que el 72% (77/107) provenían de países no pertenecientes a la Comunidad Económica Europea (CEE). El rango de edad de estos niños era de 4–13 años, con una mediana de 7 años. La proporción de niños/niñas era de 1,1. Los países extracomunitarios de origen más frecuentes eran Colombia (19%, 20/107), Venezuela (10%, 11/107), Bolivia (7%, 8/107) y Ecuador (7%, 8/107). Los países comunitarios de origen más frecuentes eran Rumanía (16%, 17/107), Francia (7%, 7/107) y Alemania (4%, 4/107).

**Tabla 9.** Principales datos sociodemográficos de los niños nacidos fuera de España participantes en la campaña de muestreo realizada en el municipio de Leganés, Madrid, España.

País	Total	4–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
	<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Alemania <sup>a</sup>	4	2	50	2	50	0	0	3	75	1	25
Argentina	2	1	50	1	50	0	0	2	100	0	0
Bolivia	8	0	0	6	75	2	25	6	75	2	25
Brasil	2	1	50	1	50	0	0	1	50	1	50
Bulgaria <sup>a</sup>	1	0	0	1	100	0	0	1	100	0	100
Chile	1	1	100	0	0	0	0	0	0	1	100
China	3	1	33	2	67	0	0	2	67	1	33
Colombia	20	8	40	10	50	2	10	9	45	11	55
Cuba	4	0	0	4	100	0	0	1	25	3	75
Ecuador	8	5	62	2	25	1	13	4	50	4	50
Francia <sup>a</sup>	7	3	43	4	57	0	0	4	57	3	43
G. Ecuatorial	2	1	50	1	50	0	0	0	0	2	100
Honduras	1	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100
Marruecos	2	1	50	0	0	1	50	0	0	2	100
México	2	0	0	2	100	0	0	1	50	1	50
Nigeria	2	2	100	0	0	0	0	2	100	0	0
Panamá	1	1	100	0	0	0	0	0	0	1	100
Paraguay	2	1	50	1	50	0	0	1	50	1	50
Perú	2	1	50	0	0	1	50	1	50	1	50
Reino Unido <sup>a</sup>	1	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0
R. Dominicana	2	1	50	1	50	0	0	1	50	1	50
Rumanía <sup>a</sup>	17	7	41	10	59	0	0	10	59	7	41
Ucrania	2	1	50	1	50	0	0	0	0	2	100
Venezuela	11	9	82	2	18	0	0	6	55	5	45
Total	107	47		53		7		56		51	

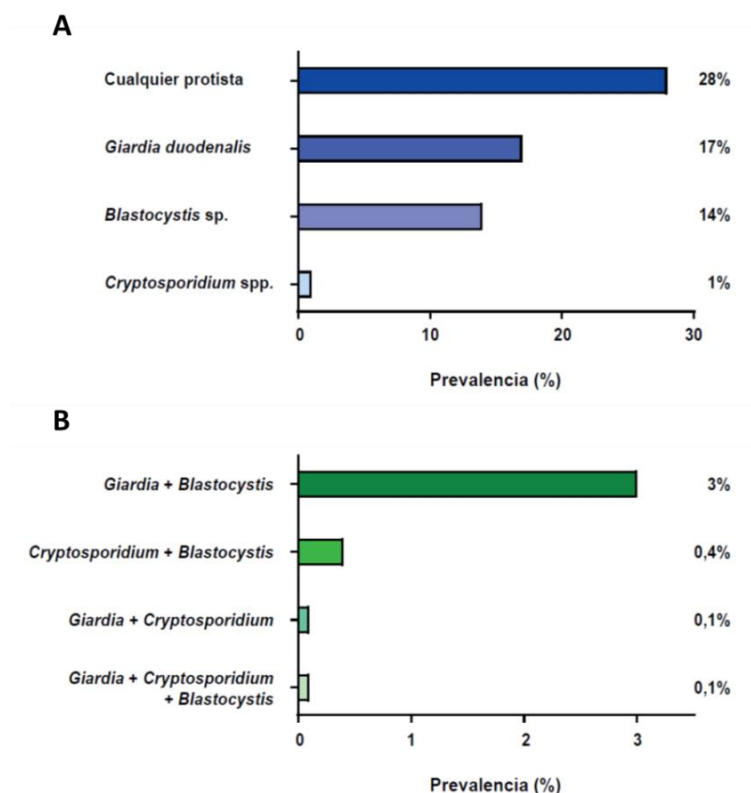
<sup>a</sup> Países pertenecientes a la CEE.

#### 4.1.3. Prevalencia general de protistas entéricos

Las especies de protistas entéricos investigadas en la población escolar asintomática del municipio de Leganés incluyeron *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp. y *E. bienersi*. *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* no fueron investigadas en esta población pediátrica (ver sección 3.6.3.). De forma general, el 28% [intervalo de confianza al 95% (IC 95%): 26–31; 382/1.356] de los niños participantes estaban infectados (o eran portadores) por al menos una de las especies parasitarias anteriormente mencionadas. *Giardia duodenalis* fue el patógeno más frecuentemente hallado (17%, IC 95%: 16–20; 237/1.356), seguido de *Blastocystis* sp. (14%, IC 95%: 12–16; 187/1.356) y *Cryptosporidium* spp. (1%, IC 95%: 0,5–2; 13/1.356). *Enterocytozoon bienersi* no fue encontrado en ninguna de las 1.356 muestras fecales analizadas (Figura 18A).

Respecto a infecciones múltiples, la presencia de dos especies parasitarias fue hallada en el 4% (53/1.356) de las muestras investigadas, siendo la coinfección más prevalente la asociada a

*Blastocystis* sp. y *G. duodenalis* (3%, 47/1.356). Mucho menos frecuentes fueron las coinfecciones debidas a *Blastocystis* sp. y *Cryptosporidium* spp. (0,4%, 5/1.356) o *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. (0,1%, 1/1.356). La presencia de los 3 patógenos fue determinada en una muestra (0,1%, 1/1.396) (Figura 18B).

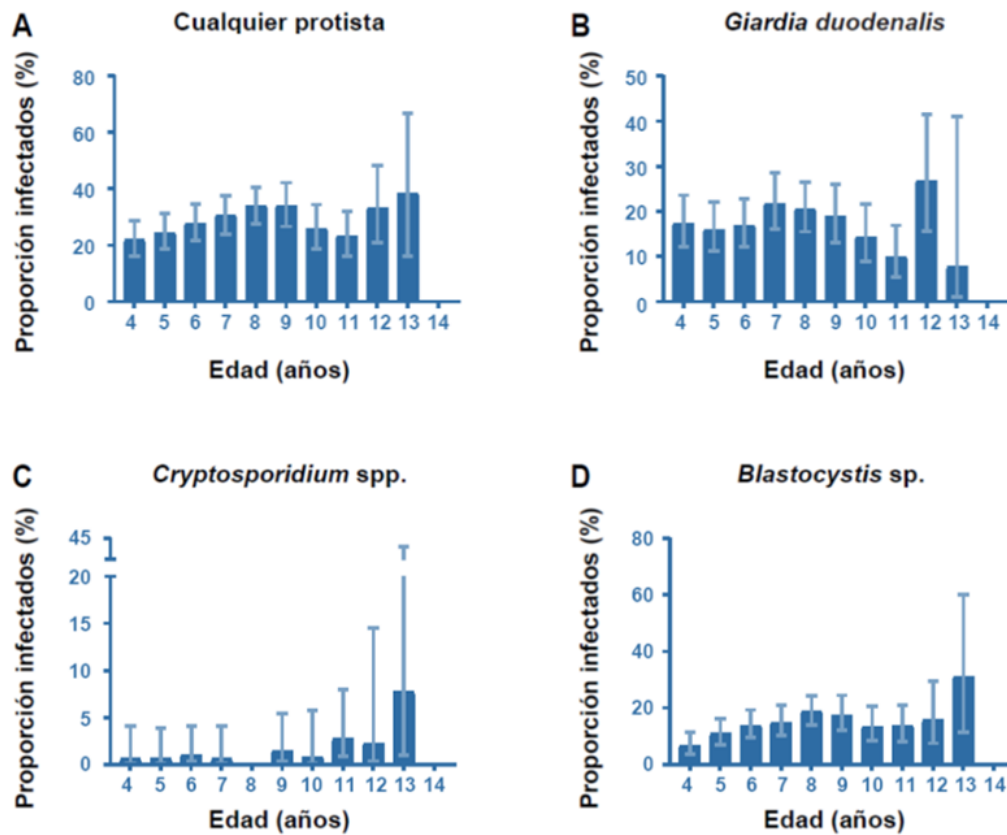


**Figura 18.** Prevalencias de *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* sp. y *Cryptosporidium* spp. en la población escolar asintomática investigada en el municipio de Leganés, Madrid, España. (A) Prevalencia global y por especie. (B) Frecuencia de coinfecciones.

#### 4.1.4. Prevalencia de protistas entéricos en función de la edad

La edad media de los niños infectados por *G. duodenalis* era de 7 años, y la de los niños infectados por *Blastocystis* sp. y *Cryptosporidium* spp. de 8 y 9 años, respectivamente. La presencia de al menos una de las 3 especies de protistas entéricos fue confirmada en niños de todas las edades comprendidas entre los 4 y los 13 años, pero no en niños de 14 años (Figura 19A). Las infecciones causadas por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. seguían patrones de distribución irregulares (Figura 19B y 19C), aunque el mayor número de casos con *Cryptosporidium* spp. fue detectado en niños de 11 a 13 años. *Cryptosporidium* spp. tampoco fue detectado en niños de 8 años. Por el contrario, la prevalencia de *Blastocystis* sp. se incrementaba en función de la edad de los niños (Figura 19D). Este patrón era especialmente patente en niños entre 4 y 9 años. Debido a la

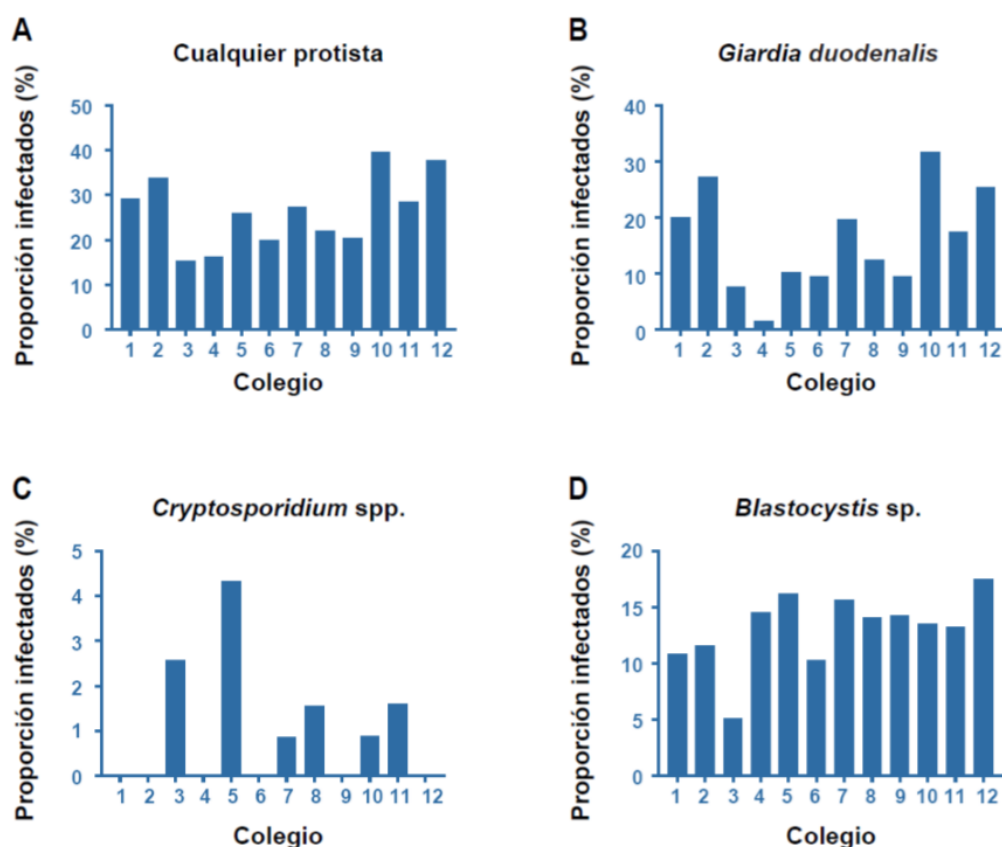
elevada prevalencia de *Blastocystis* sp. en la población pediátrica analizada, este efecto también era visible cuando se consideró a todos los protistas entéricos de forma conjunta (Figura 19A).



**Figura 19.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en función de la edad de los niños investigados en el municipio de Leganés, Madrid, España. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (D) Prevalencia de *Blastocystis* sp.

#### 4.1.5. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro educativo

Las tasas de infección por al menos una de las 3 especies de protistas entéricos detectados en los 12 centros educativos muestreados oscilaron entre el 15–40% (Figura 20A). La prevalencia de *G. duodenalis* hallada variaba entre 2–32% (Figura 20B), la de *Cryptosporidium* spp. entre 0–4% (Figura 20C) y la de *Blastocystis* sp. entre 5–18% (Figura 20D). Las grandes diferencias observadas entre centros no eran atribuibles a un tamaño muestral insuficiente. Por ejemplo, en el colegio 4 se muestrearon un total de 64 niños y la prevalencia de *G. duodenalis* fue del 2%. Sin embargo, este patógeno fue hallado en prevalencias 3–5 veces superiores en centros educativos con un número inferior de alumnos muestreados, como los colegios 7, 8 y 12 (ver Tabla 8 y Figura 20B).



**Figura 20.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en función del centro educativo muestreado en el municipio de Leganés, Madrid, España. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (D) Prevalencia de *Blastocystis* sp.

#### 4.1.6. Asociación de riesgos. Análisis univariante

Los resultados generados en el análisis univariante a partir de la información obtenida en las encuestas epidemiológicas sobre factores potencialmente asociados a un mayor riesgo de infección por protistas entéricos se muestran en la [Tabla 10](#). Los resultados fueron ajustados considerando las variaciones existentes entre centros educativos (para *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.) y grupos familiares (sólo para *G. duodenalis*), ya que ambas variables fueron identificadas como especialmente relevantes en el modelo final para las infecciones por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.

Tras el ajuste por centro educativo y grupo familiar, los niños portadores de una especie de protista entérico eran significativamente más propensos a padecer infecciones por una segunda especie parasitaria. Así, los niños portadores de *Blastocystis* sp. tenían una mayor probabilidad de estar infectados con *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. que los no portadores, y viceversa. Sin embargo, no había ninguna asociación estadísticamente significativa entre la infección por *G. duodenalis* y la infección por *Cryptosporidium* spp.

**Tabla 10.** Distribución de protistas entéricos en la población escolar ( $n = 1.356$ ) investigada en el municipio de Leganés (Madrid, España) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis univariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Exposición	<i>Giardia duodenalis</i> <sup>a</sup> ( $n = 237$ )				<i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>a</sup> ( $n = 13$ )				<i>Blastocystis</i> sp. ( $n = 187$ )			
	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>
<i>Giardia duodenalis</i>	ND	ND	ND	ND	2	15	1,11 (0,24–5,25)	0,893	48	26	1,79 (1,22–2,60)	0,001
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	0,8	1,59 (0,21–12,03)	0,653	ND	ND	ND	ND	6	3	5,50 (1,51–19,32)	0,001
<i>Blastocystis</i> sp.	48	20	2,20 (1,29–3,78)	0,004	6	46	5,46 (1,77–16,81)	0,003	ND	ND	ND	ND
Sexo (ser niña)	107	45	1,14 (0,77–1,69)	0,50	10	77	3,89 (1,05–14,36)	0,023	84	45	0,97 (0,70–1,34)	0,846
Edad (incremento anual)	ND	ND	0,95 (0,87–1,04)	0,183	ND	ND	1,27 (1,01–1,60)	0,045	ND	ND	1,09 (1,02–1,16)	0,011
Extranjero	16	7	1,00 (0,46–2,19)	0,99	2	15	2,11 (0,42–10,52)	0,362	21	11	1,53 (0,88–2,56)	0,095
Extranjero fuera CEE	16	7	1,19 (0,46–3,07)	0,72	2	15	4,01 (0,74–21,78)	0,107	19	10	1,45 (0,81–2,49)	0,160
Con hermanos	187	79	1,03 (0,75–1,39)	0,871	13	100	1,33 (0,86–2,02)	0,182	148	79	1,21 (0,79–1,91)	0,365
Contacto niños con diarrea	32	14	0,78 (0,45–1,36)	0,381	1	8	0,33 (0,42–2,60)	0,293	26	14	0,85 (0,52–1,34)	0,475
Viaje al extranjero	43	18	1,05 (0,61–1,80)	0,871	2	15	1,02 (0,22–4,72)	0,984	33	18	1,08 (0,69–1,63)	0,727
Viaje dentro CEE	10	4	0,50 (0,18–1,45)	0,202	2	15	3,19 (0,34–15,00)	0,116 <sup>c</sup>	12	6	1,22 (0,59–2,35)	0,535
Diarrea últimos 7 días	6	3	0,45 (0,15–1,38)	0,163	0	0	0,00 (0,00–6,37)	0,405 <sup>c</sup>	5	3	0,55 (0,17–1,40)	0,207
Diarrea miembro familia	27	11	0,78 (0,42–1,45)	0,212	3	23	1,48 (0,39–5,60)	0,56	29	16	1,15 (0,72–1,79)	0,518
Diarrea compañero colegio	14	6	0,79 (0,27–2,30)	0,665	2	15	0,94 (0,08–10,96)	0,946	14	8	1,31 (0,42–4,87)	0,620

CEE: Comunidad Económica Europea; OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; ND: No disponible; *P*: Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por colegio y familia. Resultados para *Cryptosporidium* spp. ajustados por colegio.

<sup>b</sup> Cocientes de probabilidad e IC 95% calculados mediante regresión logística exacta. Valor *P* extraído con la prueba exacta de Fisher de dos colas.

<sup>c</sup> Sin ajuste (sin valor de intervalo de confianza).

**Tabla 10 (continuación).** Distribución de protistas entéricos en la población escolar ( $n = 1.356$ ) investigada en el municipio de Leganés (Madrid, España) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis univariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Exposición	<i>Giardia duodenalis</i> <sup>a</sup> ( $n = 237$ )				<i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>a</sup> ( $n = 13$ )				<i>Blastocystis</i> sp. ( $n = 187$ )			
	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>	<i>n</i>	%	OR (IC 95%)	Valor <i>P</i>
Diarrea en mascotas	11	5	1,21 (0,47–3,11)	0,699	2	15	4,76 (0,92–24,65)	0,063	4	2	0,47 (0,12–1,29)	0,138
Contacto con gatos	19	8	0,78 (0,38–1,64)	0,543	0	0	0,00 (0,00–2,93)	0,251 <sup>c</sup>	13	7	0,72 (0,36–1,32)	0,279
Contacto con perros	28	12	0,57 (0,32–1,05)	0,071	3	23	1,65 (0,44–6,18)	0,454	28	15	0,99 (0,62–1,55)	0,978
Lavado de manos	207	87	1,17 (0,65–2,13)	0,60	9	69	0,40 (0,12–1,35)	0,139	167	89	1,31 (0,79–2,27)	0,278
Lavado frutas y hortalizas	232	98	1,78 (0,32–9,91)	0,513	13	100	0,27 (0,04– $\infty$ ) <sup>b,c</sup>	1,000	180	96	0,29 (0,11–0,88)	0,006
Consumo agua botella	49	21	0,94 (0,58–1,53)	0,803	2	15	0,69 (0,15–3,12)	0,637	37	20	0,84 (0,56–1,25)	0,379
Consumo agua no tratada	16	7	1,11 (0,47–2,61)	0,809	0	0	0,00 (0,00–5,27)	0,391 <sup>c</sup>	15	8	1,70 (0,87–3,13)	0,075
Nadar en piscina	93	39	0,97 (0,62–1,51)	0,577	2	15	0,30 (0,07–1,44)	0,135	73	39	1,07 (0,77–1,49)	0,673
Nadar en aguas naturales	1	0,4	1,90 (0,01–37,48)	0,674	0	0	0,00 (0,00–84,31)	0,825 <sup>c</sup>	1	0,5	1,56 (0,03–15,87)	0,689

CEE: Comunidad Económica Europea; OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; ND: No disponible; *P*: Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por colegio y familia. Resultados para *Cryptosporidium* spp. ajustados por colegio.

<sup>b</sup> Cocientes de probabilidad e IC 95% calculados mediante regresión logística exacta. Valor *P* extraído con la prueba exacta de Fisher de dos colas.

<sup>c</sup> Sin ajuste (sin valor de intervalo de confianza).

Corroborando la tendencia previamente observada en la [Figura 19D](#), la edad del niño, considerada como una variable lineal con un incremento anual, estaba positivamente correlacionada con una mayor prevalencia de *Blastocystis* sp. El mismo efecto, aunque más atenuado y en el límite de la significancia estadística, fue observado para la infección por *Cryptosporidium* spp. también considerando la variable “edad” como una variable lineal con un incremento anual.

Finalmente, el lavado de frutas y hortalizas frescas antes de ser consumidas fue identificado como un factor protector contra la infección por *Blastocystis* sp. El hecho de ser niña estaba significativamente asociado a una mayor probabilidad de padecer una infección por *Cryptosporidium* spp.

#### 4.1.7. Asociación de riesgos. Análisis multivariante

Los resultados generados en el análisis multivariante considerando únicamente aquellas variables identificadas como significativas en el análisis univariante previo, y ajustados por centro educativo y/o grupo familiar, se muestran en la [Tabla 11](#).

**Tabla 11.** Distribución de protistas entéricos en la población escolar ( $n = 1.356$ ) investigada en el municipio de Leganés (Madrid, España) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis multivariante.

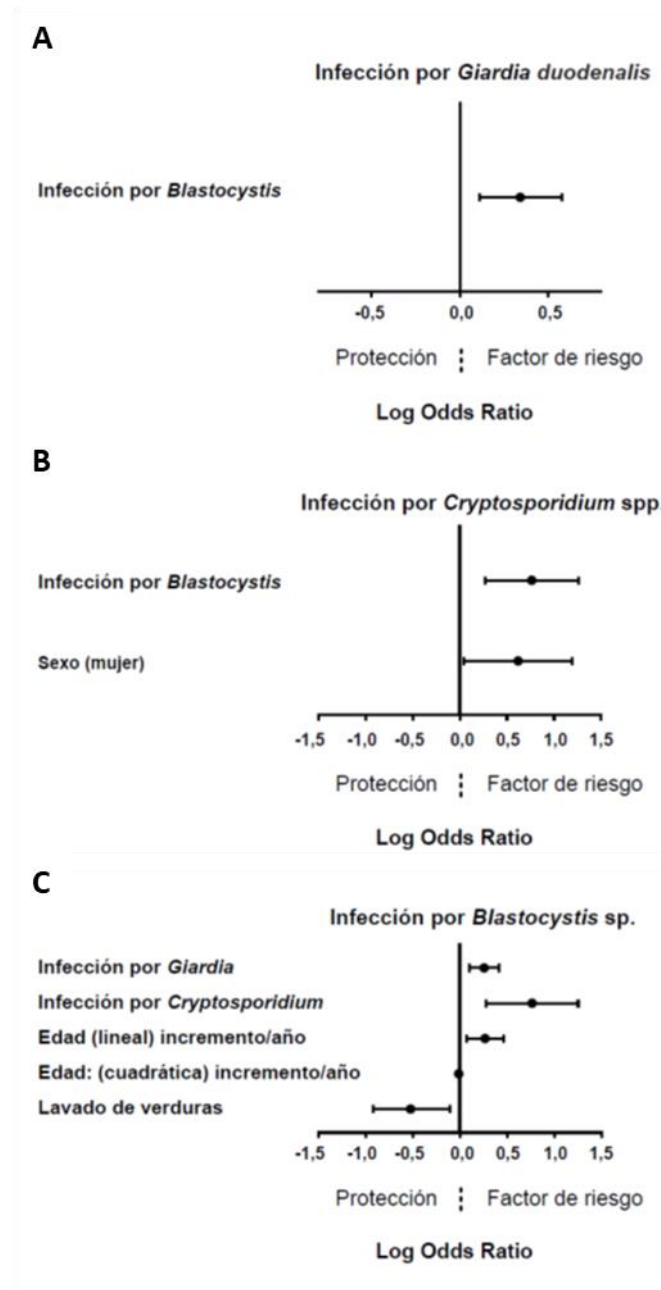
Exposición	<i>G. duodenalis</i> <sup>a</sup>	<i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>a</sup>	<i>Blastocystis</i> sp. <sup>a</sup>
	aOR (IC 95%)	aOR (IC 95%)	aOR (IC 95%)
<i>Blastocystis</i> sp.	2,20 (1,29–3,78)	5,80 (1,86–18,13)	–
<i>Giardia duodenalis</i>	–	–	1,81 (1,25–2,62)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	–	–	5,84 (1,90–17,98)
Sexo (ser niña)	–	4,16 (1,11–15,59)	–
Edad (función cuadrática)	–	–	1,85 (1,18–2,92)
Lavado frutas y hortalizas	–	–	0,30 (0,12–0,78)

aOR: Cociente de probabilidad ajustado; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* y *Blastocystis* sp. ajustados por colegio y familia. Resultados para *Cryptosporidium* spp. ajustados por colegio.

El modelo final multivariante para *G. duodenalis* sólo identificó la presencia de *Blastocystis* sp. como factor de riesgo asociado a la infección por este parásito ([Figura 21A](#)).

En el caso de la infección por *Cryptosporidium* spp., las variables consideradas como factores de riesgo en el modelo multivariante ajustado final incluyeron el ser portador de *Blastocystis* sp. y el ser niña (Figura 21B). Cuando *Blastocystis* sp. era excluido del modelo, la edad adquiría significancia estadística como factor de riesgo para la criptosporidiosis, posiblemente debido a la fuerte asociación de *Blastocystis* sp. con esta variable.



**Figura 21.** Factores de riesgo y protección identificados en el análisis multivariante. (A) Infección por *Giardia duodenalis*. (B) Infección por *Cryptosporidium* spp. (C) Infección por *Blastocystis* sp.

El modelo multivariante ajustado final para *Blastocystis* sp. confirmó que la presencia de este microorganismo estaba positivamente asociada con infecciones por *G. duodenalis* o

por *Cryptosporidium* spp. Este análisis también corroboró que la prevalencia de *Blastocystis* sp. era directamente proporcional a la edad de los niños portadores cuando esta variable era analizada como función lineal o cuadrática con un incremento anual. También se demostró el papel protector contra la infección por *Blastocystis* sp. del lavado de frutas y hortalizas previo a su consumo (Figura 21C).

#### 4.2. Muestreo en Zambézia, Mozambique

La campaña de muestreo en niños asintomáticos y sintomáticos de la provincia de Zambézia (Mozambique) fue llevada a cabo en dos etapas entre octubre de 2017 y enero de 2018, y entre enero-febrero de 2019. Los resultados presentados en esta sección han sido publicados en las referencias Muadica *et al.* (2020a,c).

De los 18 centros educativos que accedieron a colaborar en este estudio, el 94% (17/18) eran de gestión pública y el 6% (1/18) de gestión privada (Tabla 12).

**Tabla 12.** Datos de participación en los centros educativos muestreados en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Colegio	Área	Tipo de gestión	No. estudiantes total	No. estudiantes participantes	Participación (%)
1	Rural	Público	545	44	8
2	Rural	Público	496	50	10
3	Urbana	Público	459	22	5
4 <sup>a</sup>	Rural	Privado	37	22	60
5	Rural	Público	557	24	4
6	Rural	Público	476	31	7
7	Rural	Público	469	88	19
8	Rural	Público	928	60	7
9	Urbana	Público	1.096	47	4
10	Rural	Público	597	49	8
11	Rural	Público	539	47	9
12	Rural	Público	497	50	10
13	Rural	Público	519	50	10
14	Rural	Público	560	30	5
15	Rural	Público	681	30	4
16	Urbana	Público	2.111	40	2
17	Rural	Público	721	75	10
18	Rural	Público	490	48	10
Total			11.778	807	7

<sup>a</sup> Guardería.

De ellos, el 6% (1/18) incluía el tramo de educación infantil (3 a 5 años) y el resto (94%, 17/18) el tramo de educación primaria (6 a 12 años). No se muestrearon centros educativos de educación secundaria. Debido a las condiciones de desarrollo del país, la escolarización en

Mozambique está poco reglada (particularmente en áreas rurales), por lo que es común encontrar niños de diversas edades en un mismo curso académico. Los 18 centros estaban distribuidos en 10 de los 22 distritos que conforman la provincia de Zambézia incluyendo Alto Molócue ( $n = 2$ ), Gurúe ( $n = 1$ ), Ile ( $n = 2$ ), Lugela ( $n = 2$ ), Mocuba ( $n = 4$ ), Mopeia ( $n = 2$ ), Morrumbala ( $n = 2$ ), Namacurra ( $n = 1$ ), Nicoadala ( $n = 1$ ) y Quelimane ( $n = 1$ ) (ver [Figura 13](#)). El 83% (15/18) estaban situados en áreas rurales y el 17% (3/18) en áreas urbanas.

Los 7 centros de atención médica que accedieron a colaborar en este estudio incluyeron 6 centros de salud y un centro hospitalario asistencial distribuidos en los distritos de Alto Molócue ( $n = 1$ ), Gurúe ( $n = 1$ ), Ile ( $n = 1$ ), Lugela ( $n = 1$ ), Mocuba ( $n = 1$ ) y Quelimane ( $n = 2$ ) (ver [Figura 13](#)). El 43% (3/7) estaban situados en áreas rurales y el 57% (4/7) en áreas urbanas.

### 4.2.1. Participación en centros educativos en Zambézia

El censo de alumnos en los 18 centros educativos muestreados era de 11.778 (rango por centro: 37–2.111 alumnos; media: 651 alumnos). Se reclutaron un total de 807 niños aparentemente sanos sin manifestaciones clínicas relacionadas con posibles trastornos gastrointestinales ([Tabla 12](#)). La entrevista personal con cada uno de los niños participantes permitió que todos los kits recogidos fueran válidos. La tasa de participación por centro fue del 2–60%, con una media del 7%.

### 4.2.2. Datos sociodemográficos de la población escolar asintomática muestreada en Zambézia

El rango de edad de los niños asintomáticos reclutados en la campaña de muestreo en Zambézia era de 3–14 años, con una mediana de 8 años. La proporción de niños/niñas era de 1,0. Todos los niños participantes en el estudio eran naturales de Mozambique. El número de hermanos en el núcleo familiar de cada niño reclutado en el estudio era desconocido. La distribución de los niños participantes por colegio, grupo etario y sexo se muestra en la [Tabla 13](#).

La distribución de los niños asintomáticos participantes por distrito, grupo etario y sexo se muestra en la [Tabla 14](#). El número de niños reclutados por distrito osciló entre 22 (Gurúe) y 231 (Mocuba) con una media de 80,7 y una desviación estándar (DE) de 63,4. Se obtuvieron representantes para los 3 grupos etarios considerados en todos los distritos muestreados excepto para el grupo de edad de 3–6 años en Quelimane y el grupo de edad de 11–14 años en Namacurra.

**Tabla 13.** Distribución por centro educativo, edad y sexo de los niños asintomáticos participantes en la campaña de muestreo realizada en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Colegio	Total (n)	3–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 <sup>a</sup>	44	20	45	24	55	–	–	27	61	17	39
2 <sup>a</sup>	50	23	46	25	50	2	4	27	54	23	46
3 <sup>b</sup>	22	7	32	10	45	5	23	13	59	9	41
4 <sup>a</sup>	22	22	100	–	–	–	–	10	46	12	54
5 <sup>a</sup>	24	12	50	10	42	2	8	13	54	11	46
6 <sup>a</sup>	31	1	3	19	61	11	36	13	42	18	58
7 <sup>a</sup>	88	24	27	30	34	34	39	56	64	32	36
8 <sup>a</sup>	60	25	42	26	43	9	15	27	45	33	55
9 <sup>b</sup>	47	20	43	25	53	2	4	19	40	28	60
10 <sup>a</sup>	49	3	6	19	39	27	55	20	41	29	59
11 <sup>a</sup>	47	4	9	33	70	10	21	26	55	21	45
12 <sup>a</sup>	50	3	6	20	40	27	54	28	56	22	44
13 <sup>a</sup>	50	4	8	38	76	8	16	23	46	27	54
14 <sup>a</sup>	30	12	40	18	60	–	–	13	43	17	57
15 <sup>a</sup>	30	14	47	14	47	2	6	15	50	15	50
16 <sup>b</sup>	40	–	–	7	17	33	83	17	43	23	57
17 <sup>a</sup>	75	39	52	36	48	–	–	38	51	37	49
18 <sup>a</sup>	48	20	42	20	42	8	16	16	33	32	67
Total	807	253	32	374	46	180	22	401	50	406	50

<sup>a</sup> Área rural; <sup>b</sup> Área urbana.

**Tabla 14.** Distribución por distrito, edad y sexo de los niños asintomáticos participantes en la campaña de muestreo realizada en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Distrito	Total (n)	3–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto Molócue <sup>a</sup>	94	43	46	49	52	2	2	54	57	40	43
Gurúe <sup>b</sup>	22	7	32	10	45	5	23	13	59	9	41
Ile <sup>a</sup>	46	34	74	10	22	2	4	23	50	23	50
Lugela <sup>a</sup>	119	25	21	49	41	45	38	69	58	50	42
Mocuba <sup>a,b</sup>	231	87	38	106	46	38	16	104	45	127	55
Mopeia <sup>a</sup>	97	7	7	53	55	37	38	54	56	43	44
Morrumbala <sup>a</sup>	98	24	25	58	59	16	16	39	40	59	60
Namacurra <sup>a</sup>	30	12	40	18	60	–	–	13	43	17	57
Nicoadala <sup>a</sup>	30	14	47	14	47	2	6	15	50	15	50
Quelimane <sup>b</sup>	40	–	–	7	18	33	82	17	43	23	57
Total	807	253	32	374	46	180	22	401	50	406	50

<sup>a</sup> Área rural; <sup>b</sup> Área urbana.

#### 4.2.3. Datos sociodemográficos de la población pediátrica sintomática muestreada en Zambézia

El rango de edad de los 286 niños sintomáticos reclutados en la campaña de muestreo en Zambézia era de 3–14 años, con una mediana de 7 años. La proporción de niños/niñas era de

1,0. Todos los niños participantes en el estudio eran naturales de Mozambique. El número de hermanos en el núcleo familiar de cada niño reclutado en el estudio era desconocido. La distribución de los niños participantes por centro de atención médica, grupo etario y sexo se muestra en la [Tabla 15](#).

**Tabla 15.** Distribución por centro de atención médica, edad y sexo de los niños sintomáticos participantes en la campaña de muestreo realizada en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Centro médico	Total (n)	3–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 <sup>a</sup>	50	30	60	19	38	1	2	33	66	17	34
2 <sup>b</sup>	25	18	72	4	16	3	12	16	64	9	36
3 <sup>a</sup>	15	7	47	7	47	1	6	10	67	5	33
4 <sup>a</sup>	52	23	44	19	37	10	19	22	42	30	58
5 <sup>a</sup>	42	16	38	12	29	14	33	25	60	17	40
6 <sup>b</sup>	29	12	41	11	38	6	21	13	45	16	55
7 <sup>b,c</sup>	73	29	40	30	41	14	19	32	44	41	56
Total	286	135	47	102	36	49	17	143	50	143	50

<sup>a</sup> Área rural; <sup>b</sup> Área urbana; <sup>c</sup> Centro hospitalario asistencial.

La distribución de los niños sintomáticos participantes por distrito, grupo etario y sexo se muestra en la [Tabla 16](#). El número de niños reclutados por distrito osciló entre 15 (Ile) y 102 (Quelimane) con una media de 48,3 y una DE de 29,8. Se obtuvieron representantes para los 3 grupos etarios considerados en todos los distritos muestreados.

**Tabla 16.** Distribución por distrito, edad y sexo de los niños sintomáticos participantes en la campaña de muestreo realizada en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Distrito	Total (n)	3–6 años		7–10 años		11–14 años		Niños		Niñas	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Alto Molócue <sup>a</sup>	50	30	60	19	38	1	2	33	66	17	34
Gurúe <sup>b</sup>	25	18	72	4	16	3	12	16	64	9	36
Ile <sup>a</sup>	15	7	47	7	47	1	6	10	67	5	33
Lugela <sup>a</sup>	52	23	44	19	36	10	20	22	42	30	58
Mocuba <sup>a,b</sup>	42	16	38	12	29	14	33	25	60	17	40
Quelimane <sup>b</sup>	102	41	40	41	40	20	20	45	44	57	56
Total	286	135	47	102	36	49	17	143	50	143	50

<sup>a</sup> Área rural; <sup>b</sup> Área urbana.

#### 4.2.4. Prevalencia general de protistas entéricos

Las especies de protistas entéricos investigadas en la población escolar (asintomática) y clínica (sintomática) de la provincia de Zambézia incluyeron *G. duodenalis*, *E. histolytica*, *E. dispar*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* ([Tabla 17](#)). De forma general, el 52% (IC 95%: 49–55; 568/1.093) de los niños participantes estaban infectados (o eran portadores) por al menos una de las especies parasitarias anteriormente mencionadas.

**Tabla 17.** Porcentaje de niños infectados por protistas entéricos en los 10 distritos muestreados en la provincia de Zambézia, Mozambique.

	Todos los niños (n = 1.093)		Niños asintomáticos (n = 807)		Niños sintomáticos (n = 286)	
	Infectados (n)	% (IC 95%)	Infectados (n)	% (IC 95%)	Infectados (n)	% (IC 95%)
<b>Protozoos</b>						
<i>Giardia duodenalis</i>	456	42 (39-45)	336	42 (39-45)	120	42 (36-48)
<i>Entamoeba dispar</i>	121	11 (9-13)	112	14 (12-17)	6	2 (0,9-5)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	13	1 (0,7-2)	11	1 (0,7-2)	2	1 (0,2-3)
<b>Estramenópilos</b>						
<i>Blastocystis</i> sp.	154 <sup>a</sup>	14 (12-16)	143 <sup>a</sup>	18 (15-21)	11 <sup>a</sup>	4 (2-7)
<b>Microsporidios</b>						
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	3	0,3 (0,1-0,8)	3	0,4 (0,1-1)	0	0
Cualquiera de las especies	568	52 (49-55)	437	54 (51-58)	131	46 (40-52)
Coinfecciones 2 o más especies	101	9 (8-11)	94	12 (10-14)	7	2 (1-5)
Coinfecciones 3 o más especies	37	3 (2-5)	36	4 (3-6)	1	0,3 (0,0-2)
Coinfecciones 4 especies	1	0,1 (0,0-0,5)	1	0,1 (0,0-0,7)	0	0

<sup>a</sup> Diagnóstico confirmado por secuenciación (ver sección 4.5.3.).

Los niños asintomáticos (54%, IC 95%:51–58; 437/807) presentaban mayores tasas de infección por protistas entéricos que los sintomáticos (46%, IC 95%: 40–52, 131/286), aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa. *Giardia duodenalis* fue el patógeno más frecuentemente hallado (42%, IC 95%: 39–45; 456/1.093), seguido de *Blastocystis* sp. (14%, IC 95%: 12–16; 154/1.093), *E. dispar* (11%, IC 95%: 9–13; 121/1.093), *Cryptosporidium* spp. (1%, IC 95%: 0,7–2; 13/1.093) y *E. bienersi* (0,3%, IC 95%: 0,1–0,8; 3/1.093). *Entamoeba histolytica* no fue encontrada en ninguna de las 1.093 muestras fecales analizadas. Tanto *E. dispar* como *Blastocystis* sp. eran más prevalentes en niños asintomáticos (14% y 18%, respectivamente) que en niños sintomáticos (2% y 4%, respectivamente). *Enterocytozoon bienersi* fue hallado en niños asintomáticos, pero no en niños sintomáticos (Tabla 17).

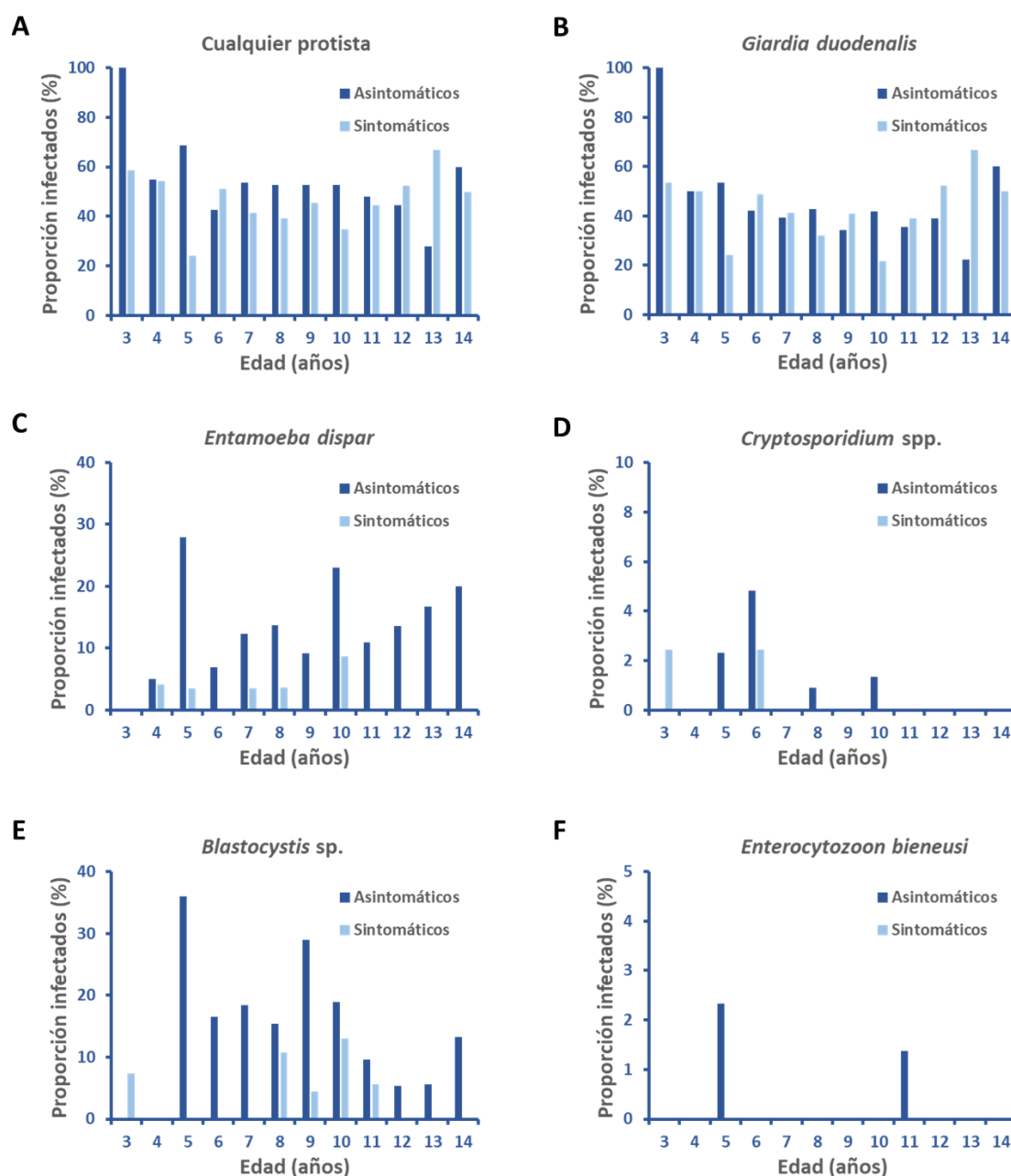
Respecto a infecciones múltiples, la presencia de dos especies parásitas fue hallada en el 9% (101/1.093) de las muestras investigadas, siendo las coinfecciones más prevalentes las asociadas a *Blastocystis* sp. y *G. duodenalis* (4%, 47/1.093) y a *E. dispar* y *G. duodenalis* (3%, 37/1.093). La presencia de 3 patógenos fue determinada en 37 muestras (3%, 37/1.093) y la de 4 patógenos en una muestra (0,1%, 1/1.093) (Tabla 17).

#### 4.2.5. Prevalencia de protistas entéricos en función de la edad

La edad media de los niños infectados por *G. duodenalis*, *E. dispar* y *Blastocystis* sp. era de 8 años, y la de los niños infectados por *Cryptosporidium* spp. y *E. bienersi* de 6 y 7 años, respectivamente. La presencia de al menos una de las 5 especies de protistas entéricos fue confirmada en niños tanto asintomáticos como sintomáticos de todas las edades comprendidas entre los 3 y los 14 años (Figura 22A).

La presencia de *G. duodenalis* en la población pediátrica analizada seguía un patrón de distribución relativamente homogéneo, independientemente de la edad y la presencia o no de manifestaciones clínicas (Figura 22B). *Entamoeba dispar* no fue identificada en niños de 3 años, y su prevalencia parecía estar ligada a la edad del niño. Esta tendencia era particularmente evidente en niños asintomáticos a partir de 11 años (Figura 22C).

Las infecciones por *Cryptosporidium* spp. seguían patrones de distribución irregulares (Figura 22D), aunque el mayor número de casos fue detectado en niños de hasta 6 años. A partir de esta edad los únicos casos identificados fueron hallados en niños asintomáticos. La distribución de *Blastocystis* sp. también mostraba un perfil muy irregular, encontrándose en niños, preferentemente asintomáticos, de todas las edades excepto en los de 4 años (Figura 22E). Finalmente, *E. bienersi* fue esporádicamente identificado en niños asintomáticos de 5 y 11 años (Figura 22F).

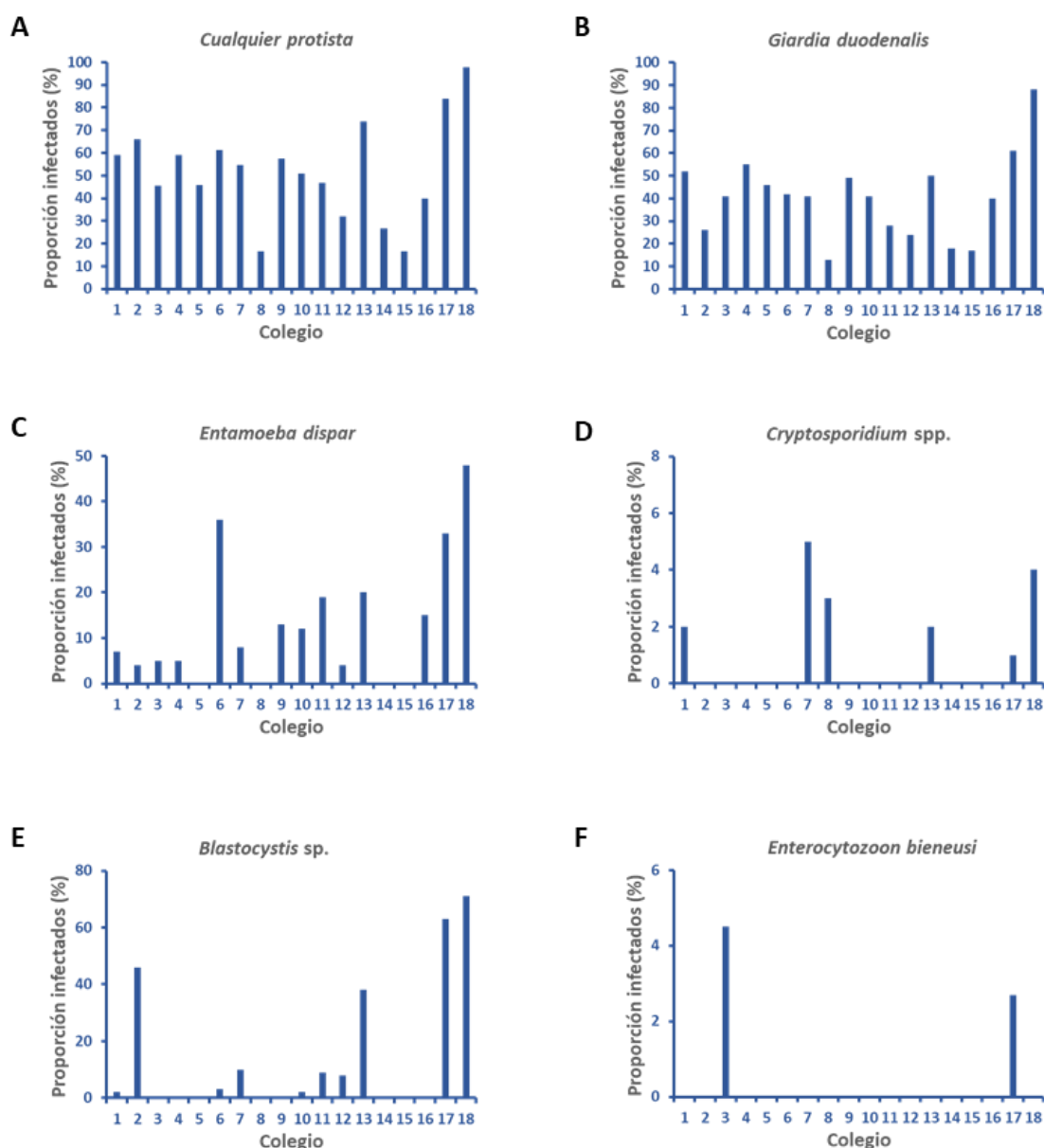


**Figura 22.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en función de la edad de los niños asintomáticos y sintomáticos investigados en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Entamoeba dispar*. (D) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (E) Prevalencia de *Blastocystis* sp. (F) Prevalencia de *Enterocytozoon bieneusi*.

#### 4.2.6. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro educativo

Las tasas de infección por al menos una de las 5 especies de protistas entéricos detectados en los 18 centros educativos muestreados oscilaron entre el 17–98% (Figura 23A). La prevalencia de *G. duodenalis* hallada variaba entre 13–88% (Figura 23B), la de *E. dispar* entre 0–48%

(Figura 23C), la de *Cryptosporidium* spp. entre 0–5% (Figura 23D), la de *Blastocystis* sp. entre 0–71% (Figura 23E) y la de *E. bieneusi* entre 0–5% (Figura 23F).



**Figura 23.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en niños asintomáticos en función del centro educativo investigado en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Entamoeba dispar*. (D) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (E) Prevalencia de *Blastocystis* sp. (F) Prevalencia de *Enterocytozoon bieneusi*.

Las especies *G. duodenalis*, *E. dispar* y *Blastocystis* sp. fueron identificadas en al menos 10 de los 18 centros educativos muestreados, mientras que *Cryptosporidium* spp. y *E. bieneusi* fueron esporádicamente identificados en un número limitado de colegios. Algunos centros

educativos (p.e. el 17 y 18, y en menor medida el 13 y el 6) destacaron por las elevadas tasas de parasitación múltiple observadas en sus alumnos (Figura 23A, 23B, 23C y 23E).

#### 4.2.7. Prevalencia de protistas entéricos en función del centro de atención médica

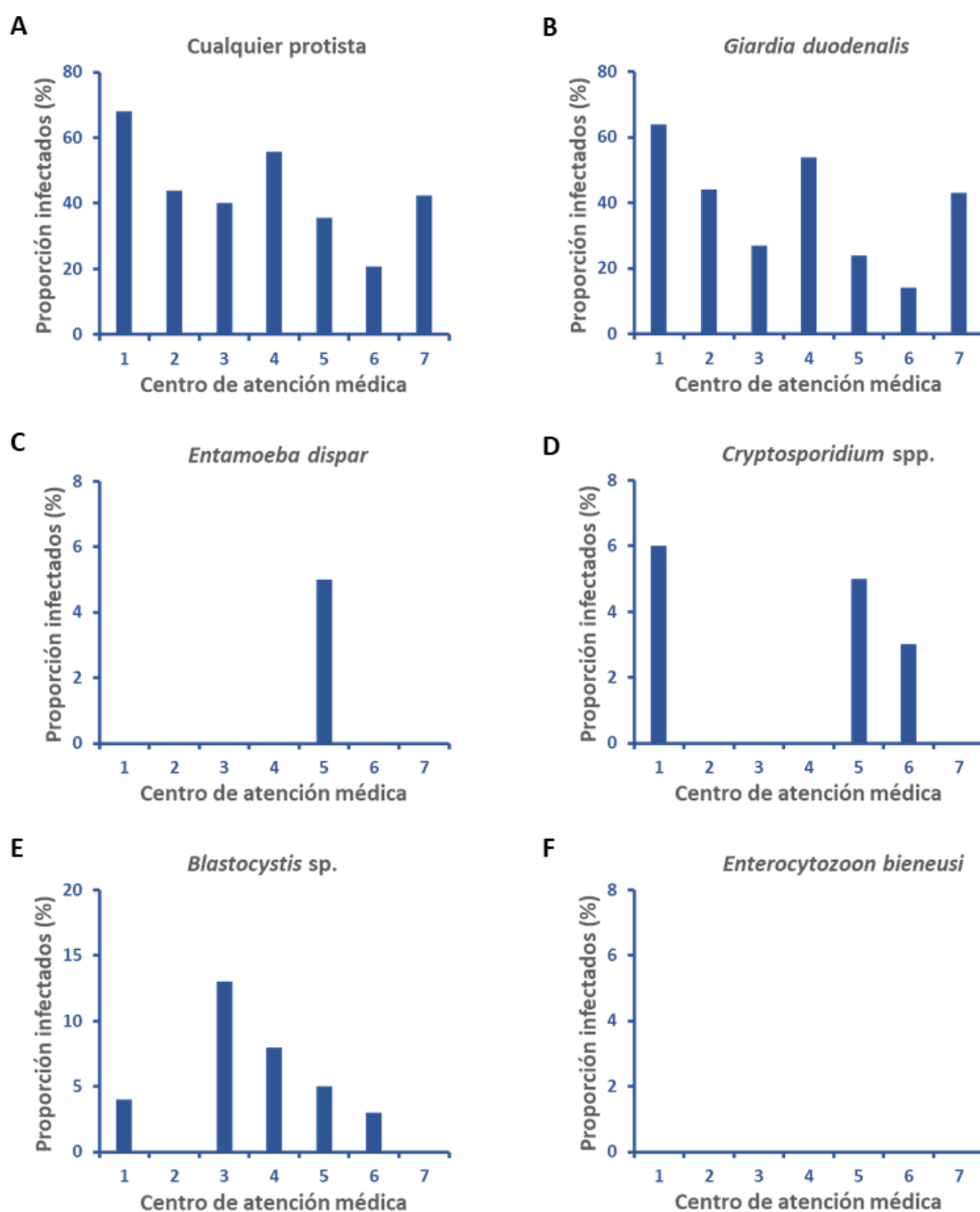
Las tasas de infección por al menos una de las 5 especies de protistas entéricos investigadas en los 7 centros de atención médica muestreados oscilaron entre el 21–68% (Figura 24A). La presencia de *G. duodenalis* variaba entre 14–64% (Figura 24B), mientras que *E. dispar* fue hallada en un único centro de salud con una frecuencia del 5% (Figura 24C). *Cryptosporidium* spp. fue identificado en 3 centros con tasas de infección del 3–6% (Figura 24D), y *Blastocystis* sp. en 5 centros con tasas de infección del 3–13% (Figura 24E). *Enterocytozoon bieneusi* no fue encontrado en la población pediátrica sintomática investigada (Figura 24F).

Las manifestaciones clínicas reportadas en los niños atendidos en los 7 centros de atención médica investigados en el momento de la recogida de muestras se indican en la Tabla 18. Los síntomas más frecuentemente identificados en los niños infectados por al menos una especie parasitaria eran diarrea (82%, 107/131), debilidad (51%, 67/131) y pérdida de apetito (25%, 33/131). Estos mismos síntomas, en proporciones muy similares, eran también los más comunes en la población sintomática total analizada. La diarrea fue el principal síntoma observado en niños infectados con *G. duodenalis* (84%), *E. dispar* (67%) y *Blastocystis* sp. (83%). Ninguno de los 2 niños con infecciones por *Cryptosporidium* spp. presentaban diarrea. De los 6 casos positivos a *E. dispar*, tan sólo 2 correspondían a monoinfecciones por esta especie. Las únicas asociaciones estadísticamente significativas halladas fueron presencia de *G. duodenalis* y diarrea (OR 3,3; IC 95%: 1,7–6,4;  $P = 0.000$ ) y presencia de *Cryptosporidium* spp. con dolor abdominal (OR 12,8; IC 95%: 2,8–infinito;  $P = 0.0258$ ). Para la evaluación correcta de estos datos deben considerarse posibles factores distorsionantes como el limitado número de casos positivos a alguna de las especies parasitarias detectadas o el hecho de que en este estudio no se ha investigado la posible presencia de patógenos intestinales de origen vírico o bacteriano.

#### 4.2.8. Prevalencia de protistas entéricos en función del distrito

La prevalencia de protistas entéricos en la población pediátrica investigada combinada (asintomática y sintomática) en función del distrito muestreado se indica en la Figura 25. Las tasas de infección por al menos una de las 5 especies parasitarias objeto de estudio variaban entre el 16% en el distrito de Nicoadala y el 87% del distrito de Morrumbala (Figura 25A). Este último distrito presentaba las prevalencias más altas para *G. duodenalis* (68%, Figura 25B), *E. dispar* (34%, Figura 25C), *Cryptosporidium* spp. (3%, Figura 25D) y *Blastocystis* sp. (54%, Figura

25E) halladas en la provincia de Zambézia. *Enterocytozoon bieneusi* fue identificado solamente en los distritos de Gurúe y Mocuba (Figura 25F).

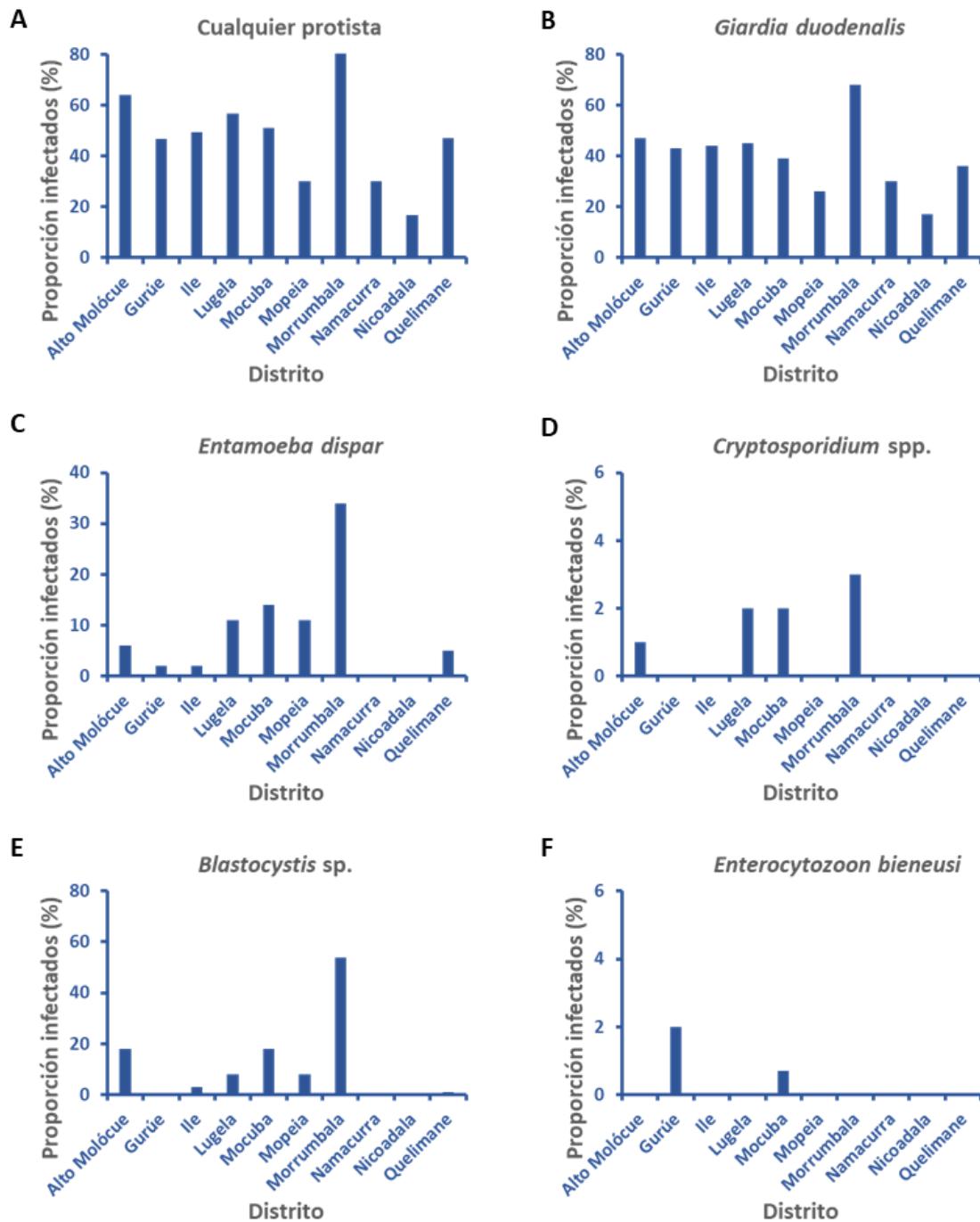


**Figura 24.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en niños sintomáticos en función del centro de atención médica investigado en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Entamoeba dispar*. (D) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (E) Prevalencia de *Blastocystis* sp. (F) Prevalencia de *Enterocytozoon bieneusi*.

**Tabla 18.** Manifestaciones clínicas reportadas en los niños sintomáticos atendidos en los 7 centros de atención médica muestreados en la provincia de Zambézia, Mozambique.

Síntoma	Todos los niños (n = 286)		Niños parasitados (n = 131) <sup>a</sup>		<i>Giardia duodenalis</i> (n = 120)		<i>Entamoeba dispar</i> (n = 6)		<i>Cryptosporidium</i> spp. (n = 2)		<i>Blastocystis</i> sp. (n = 11)	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Diarrea	210	73	107	82	101	84	4	67	0	0	10	91
Debilidad	141	49	67	51	65	54	3	50	0	0	6	55
Pérdida de apetito	74	26	33	25	32	27	0	0	1	50	1	9
Vómito	48	17	22	17	21	18	1	17	1	50	4	36
Dolor abdominal	44	15	19	15	14	12	1	17	2	100	2	18
Prurito anal	6	2	2	2	1	1	0	0	1	50	0	0
Cefalea	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fiebre	5	2	3	2	3	3	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Un total de 8 niños estaban parasitados por más de una especie de protozoario entérico.



**Figura 25.** Prevalencia de las especies de protistas entéricos objeto de estudio en niños asintomáticos y sintomáticos en función del distrito investigado en la provincia de Zambézia, Mozambique. (A) Prevalencia conjunta por cualquier protista. (B) Prevalencia de *Giardia duodenalis*. (C) Prevalencia de *Entamoeba dispar*. (D) Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (E) Prevalencia de *Blastocystis* sp. (F) Prevalencia de *Enterocytozoon bienersi*.

#### 4.2.9. Asociación de riesgos. Análisis univariante

Los resultados generados en el análisis univariante a partir de la información obtenida en las encuestas epidemiológicas sobre factores potencialmente asociados a un mayor riesgo de

infección por protistas entéricos se muestran en la [Tabla 19](#). En el análisis se incluyeron conjuntamente los niños asintomáticos y los niños sintomáticos, al considerarse que todos ellos estaban expuestos en igual medida a las variables estudiadas. Esta decisión permitía además aumentar la potencia de las pruebas estadísticas realizadas. Respecto al tratamiento del agua para consumo humano, las variables “cloración” y “hervido” fueron combinadas y consideradas de forma única, ya que el 13% (139/1.093) de los niños declararon beber agua clorada, el 0,5% (5/1.093) agua hervida y el 0,6% (7/1.093) agua tratada por ambos métodos. Las variables “lavado de manos” y “lavado de frutas y hortalizas” fueron excluidas del análisis ya que la gran mayoría de los niños encuestados afirmaron llevar a cabo ambas prácticas, suscitando dudas sobre la veracidad de la información proporcionada. Los resultados fueron ajustados considerando las variaciones existentes entre distritos (para *G. duodenalis*, *Blastocystis* sp. y *E. bienesi*), barriadas (para *G. duodenalis* y *E. dispar*) y manifestaciones clínicas (sólo para *E. dispar*), ya que estas variables fueron identificadas como especialmente relevantes en el modelo final para las infecciones por *G. duodenalis*, *E. dispar*, *Blastocystis* sp. y *E. bienesi*.

Las variables asociadas a un mayor riesgo de infección por *G. duodenalis* incluyeron la presencia de otros protistas entéricos como *E. dispar* y *Blastocystis* sp., el contacto directo con familiares presentando episodios de diarrea y el contacto habitual con animales domésticos como pollos/gallinas, patos, gatos y perros. Todos los tipos de agua de consumo (tanto primarios como secundarios) y de materiales de construcción de las viviendas (exceptuando el adobe) estaban significativamente asociadas a una mayor probabilidad de padecer una infección por *G. duodenalis*, así como el hecho de no disponer de letrina dentro o fuera de la vivienda.

Las variables asociadas a un mayor riesgo de ser portador de *E. dispar* incluyeron la presencia de otros protistas entéricos como *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp., vivir en un área rural, no manifestar síntomas gastrointestinales y tener contacto habitual con patos. El agua de consumo procedente de fuentes primarias o secundarias estaba fuertemente ligada a una mayor probabilidad de ser portador de *E. dispar*, así como habitar una vivienda construida con materiales de baja calidad y no disponer de letrina.

La única variable asociada a un mayor riesgo de infección por *Cryptosporidium* spp. era la edad del niño, de forma inversamente proporcional. La falta de potencia estadística impidió que este patógeno fuese incluido en el análisis multivariante.

**Tabla 19.** Distribución de protistas entéricos en la población pediátrica asintomática y sintomática ( $n = 1.093$ ) investigada en la provincia de Zambézia (Mozambique) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis univariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Exposición	<i>Giardia duodenalis</i> <sup>a</sup> ( $n = 456$ )			<i>Entamoeba dispar</i> <sup>a</sup> ( $n = 121$ )			<i>Cryptosporidium</i> spp. ( $n = 13$ )			<i>Blastocystis</i> sp. <sup>a</sup> ( $n = 154$ )		
	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>
<i>G. duodenalis</i>	456 (100)	ND	ND	75 (62)	2,5 (1,7-3,8)	0,000	5 (39)	0,9 (0,2-3,0)	0,795	85 (55)	1,9 (1,3-2,7)	0,000
<i>E. dispar</i>	75 (16)	2,5 (1,7-3,8)	0,000	121 (100)	ND	ND	1 (8)	0,7 (0,0-4,6)	0,696	46 (30)	4,9 (3,1-7,6)	0,000
<i>Cryptosporidium</i> spp.	5 (1)	0,9 (0,2-3,0)	0,795	1 (0,8)	0,7 (0,0-4,6)	0,696	13 (100)	ND	ND	2 (1)	1,1 (0,1-5,2)	0,893
<i>Blastocystis</i> sp.	85 (19)	1,9 (1,3-2,7)	0,000	46 (38)	4,9 (3,1-7,6)	0,000	2 (15)	1,1 ((0,1-5,2)	0,893	154 (100)	ND	ND
Edad (incremento anual)	ND	1,0 (0,9-1,00)	0,075	ND	1,1 (0,9-1,1)	0,15	ND	0,7 (0,6-0,9)	0,015	ND	1,0 (0,9-1,0)	0,086
Sexo (ser niña)	239 (52)	1,1 (0,9-1,5)	0,300	66 (55)	1,2 (0,8-1,8)	0,314	6 (46)	0,9 (0,2-3,0)	0,768	81 (53)	1,1 (0,8-1,6)	0,526
Rural (vs. urbano)	358 (78)	1,3 (0,9-1,7)	0,1	105 (87)	2,3 (1,3-4,2)	0,002	11 (85)	1,8 (0,4-16,8)	0,441	152 (99)	30 (8,1-252)	0,000
Sintomático	120 (26)	1,0 (0,8-1,3)	0,988	6 (5)	0,1 (0,05-0,3)	0,000	2 (15)	0,6 (0,05-2,3)	0,374	11 (7)	0,2 (0,1-0,4)	0,000
Diarrea miembro familia	62 (14)	2,3 (1,5-3,5)	0,000	13 (11)	1,2 (0,6-2,2)	0,601	0 (0)	0 (0,0-2,8)	0,242	10 (7)	0,6 (0,3-1,3)	0,178
Contacto con pollos/gallinas	35 (8)	3,0 (1,6-5,8)	0,000	6 (5)	1,1 (0,4-2,5)	0,912	0 (0)	0 (0,0-5,9)	0,418	9 (6)	1,3 (0,5-2,8)	0,494
Contacto con patos	23 (5)	17 (4,1-146,3)	0,000	9 (7)	4,8 (1,8-11,8)	0,000	2 (15)	8,4 (0,9-41,5)	0,001	11 (7)	5,1 (2,0-12,3)	0,000
Contacto con gatos	87 (19)	1,7 (1,2-2,4)	0,002	18 (15)	1,0 (0,5-1,7)	0,943	2 (15)	1,0 (0,1-4,8)	0,977	22 (14)	0,9 (0,5-1,5)	0,762
Contacto con perros	37 (8)	1,8 (1,1-3,1)	0,017	11 (9)	1,7 (0,8-3,3)	0,135	0 (0)	0 (0,0-4,6)	0,358	7 (5)	0,7 (0,3-1,6)	0,401
Agua bebida grifo (1º o 2º)	86 (19)	0,6 (0,5-0,9)	0,002	10 (8)	0,3 (0,1-0,5)	0,000	3 (23)	1,0 (0,2-3,8)	0,964	8 (5)	0,2 (0,1-0,3)	0,000
Agua bebida río (1º o 2º)	78 (17)	2,3 (1,5-3,3)	0,000	13 (11)	0,9 (0,4-1,6)	0,645	0 (0)	0,0 (0,0-2,1)	0,180	14 (9)	0,7 (0,4-1,3)	0,226
Agua bebida pozo (1º o 2º)	369 (81)	1,4 (1,0-1,8)	0,045	107 (88)	2,4 (1,3-4,5)	0,003	12 (92)	3,5 (0,5-149)	0,205	146 (95)	6,1 (3,0-14,6)	0,000
Agua bebida grifo (1º)	28 (6)	2,1 (1,1-4,0)	0,012	7 (6)	1,4 (0,5-3,3)	0,399	0 (0)	0 (0,0-6,6)	0,441	4 (3)	0,6 (0,1-1,6)	0,257
Agua bebida río (1º)	75 (16)	0,6 (0,5-0,9)	0,002	8 (7)	0,2 (0,1-0,5)	0,000	1 (8)	0,3 (0,0-2,1)	0,240	6 (4)	0,1 (0,1-0,3)	0,000
Agua bebida pozo (1º)	354 (78)	1,3 (0,9-1,7)	0,09	106 (88)	2,6 (1,5-4,9)	0,001	12 (92)	4,1 (0,6-175)	0,144	144 (94)	5,7 (2,9-12,2)	0,000
Vivienda de adobe	200 (44)	0,9 (0,7-1,2)	0,564	51 (42)	0,9 (0,6-1,3)	0,551	6 (46)	1,1 (0,3-3,7)	0,915	55 (36)	0,7 (0,5-0,9)	0,016
Vivienda de ladrillo	42 (9)	0,5 (0,3-0,7)	0,000	14 (12)	0,8 (0,4-1,5)	0,463	2 (15)	1,1 (0,1-5,3)	0,862	19 (12)	0,9 (0,5-1,5)	0,586

OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; ND: No disponible; *P*: Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por distrito y barriada. Resultados para *E. dispar* ajustados por barriada y sintomatología. Resultados para *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* ajustados por distrito.

**Tabla 19 (continuación).** Distribución de protistas entéricos en la población pediátrica asintomática y sintomática ( $n = 1.093$ ) investigada en la provincia de Zambézia (Mozambique) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis univariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Exposición	<i>Giardia duodenalis</i> <sup>a</sup> ( $n = 456$ )			<i>Entamoeba dispar</i> <sup>a</sup> ( $n = 121$ )			<i>Cryptosporidium</i> spp. ( $n = 13$ )			<i>Blastocystis</i> sp. <sup>a</sup> ( $n = 154$ )		
	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>	<i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	<i>P</i>
Vivienda de madera	56 (12)	0,6 (0,4–0,8)	<b>0,001</b>	16 (13)	0,7 (0,4–1,3)	0,293	1 (8)	0,4 (0,0–2,9)	0,386	33 (21)	1,5 (0,9–2,3)	0,081
Vivienda otro material <sup>b</sup>	160 (35)	2,5 (1,9–3,3)	<b>0,000</b>	40 (33)	1,6 (1,0–2,4)	<b>0,030</b>	4 (31)	1,3 (0,3–4,8)	0,63	47 (31)	1,4 (0,9–2,0)	0,088
Sin letrina	87 (19)	1,8 (1,3–2,6)	<b>0,001</b>	26 (22)	1,7 (1,0–2,8)	<b>0,024</b>	3 (23)	1,8 (0,3–7,0)	0,387	34 (22)	1,8 (1,2–2,8)	<b>0,005</b>

OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; ND: No disponible; *P*: Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por distrito y barriada. Resultados para *E. dispar* ajustados por barriada y sintomatología. Resultados para *Blastocystis* sp. y *E. bienewisi* ajustados por distrito.

<sup>b</sup> Bloques prefabricados de hormigón y techumbre de paja o placas de zinc.

**Tabla 19 (continuación).** Distribución de protistas entéricos en la población pediátrica asintomática y sintomática ( $n = 1.093$ ) investigada en la provincia de Zambézia (Mozambique) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis univariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Exposición	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> <sup>a</sup> ( $n = 3$ )		
	$n$ (%)	OR (IC 95%)	$P$
<i>G. duodenalis</i>	3 (100)	0,0 (1,1–7,4)	<b>0,042</b>
<i>E. dispar</i>	1 (33)	4,1 (0,1–78,0)	0,218
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0 (0)	0,0 (0,0–114)	0,849
<i>Blastocystis</i> sp.	2 (67)	12,3 (0,6–729)	<b>0,009</b>
<i>E. bieneusi</i>	3 (100)	ND	ND
Edad (incremento anual)	ND	0,9 (0,6–1,4)	0,548
Sexo (ser niña)	1 (33)	0,5 (0,0–9,5)	0,558
Rural (vs. urbano)	2 (67)	0,7 (0,0–38,4)	0,722
Sintomático	0 (0)	0,0 (0,0–3,6)	0,302
Diarrea miembro familia	0 (0)	0,0 (0,0–12,4)	0,576
Contacto con pollos/gallinas	0 (0)	0,0 (0,0–26,0)	0,698
Contacto con patos	0 (0)	0,0 (0,0–56,7)	0,791
Contacto con gatos	1 (33)	2,8 (0,1–54,5)	0,377
Contacto con perros	1 (33)	7,9 (0,1–153)	<b>0,047</b>
Agua bebida grifo (1º o 2º)	1 (33)	1,6 (0,0–31,2)	0,691
Agua bebida río (1º o 2º)	0 (0)	0,0 (0,0–9,4)	0,521
Agua bebida pozo (1º o 2º)	3 (100)	0,0 (0,2–13,1)	0,354
Agua bebida grifo (1º)	1 (33)	1,9 (0,0–36,7)	0,594
Agua bebida río (1º)	0 (0)	0,0 (0,0–28,9)	0,713
Agua bebida pozo (1º)	2 (67)	0,7 (0,0–39,8)	0,744
Vivienda de adobe	0 (0)	0,0 (0,0–1,6)	0,119
Vivienda de ladrillo	0 (0)	0,0 (0,0–8,1)	0,489
Vivienda de madera	1 (33)	2,5 (0,0–48,7)	0,434
Vivienda otro material <sup>b</sup>	2 (37)	0,5 (0,0–26,4)	0,671
Sin letrina	2 (67)	11,8 (0,6–697)	<b>0,011</b>

OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; ND: No disponible;  $P$ : Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por distrito y barriada. Resultados para *E. dispar* ajustados por barriada y sintomatología. Resultados para *Blastocystis* sp. y *E. bieneusi* ajustados por distrito.

<sup>b</sup> Bloques prefabricados de hormigón y techumbre de paja o placas de zinc.

Las variables asociadas a un mayor riesgo de ser portador de *Blastocystis* sp. incluyeron la presencia de *G. duodenalis* o *E. dispar*, vivir en un área rural, no manifestar síntomas gastrointestinales y tener contacto habitual con patos. La procedencia del agua de bebida tanto primaria como secundaria y la carencia de letrina eran también variables relacionadas con una mayor probabilidad de padecer una infección por *Blastocystis* sp.

Finalmente, la única variable asociada a un mayor riesgo de infección por *E. bieneusi* era la presencia de *G. duodenalis*. Las variables “presencia de *Blastocystis* sp.”, “contacto habitual con perros” y “ausencia de letrina” no eran significativas al estar el valor 1 incluido en el rango del intervalo.

#### 4.2.10. Asociación de riesgos. Análisis multivariante

Los resultados generados en el análisis multivariante considerando únicamente aquellas variables identificadas como significativas en el análisis univariante previo, y ajustados por distrito y barriada se muestran en la [Tabla 20](#). *Cryptosporidium* spp. y *E. bieneusi* fueron excluidos del análisis debido a la insuficiente potencia estadística asociada al limitado número de muestras positivas ( $n = 13$  y  $n = 3$ , respectivamente) a estos patógenos.

Los riesgos asociados a *G. duodenalis* incluyeron el contacto directo con familiares presentando episodios de diarrea, el contacto habitual con animales domésticos incluyendo patos, perros y gatos, y el habitar una vivienda de baja calidad constructiva. Usar agua de ríos y manantiales como fuente primaria de agua de bebida también era un riesgo asociado a la infección por *G. duodenalis*, aunque este efecto era mitigado cuando el agua era tratada mediante cloración o hervido. Este tratamiento también disminuía la probabilidad de infección por *G. duodenalis* en aquellos niños que no usaban agua de ríos/manantiales como fuente de bebida primaria o secundaria.

Los riesgos asociados a *E. dispar* incluyeron usar agua de ríos y manantiales como fuente primaria de agua de bebida (sin que el tratamiento con cloración o hervido tuviese efecto), el ser portador de *Blastocystis* sp., el contacto habitual con patos y el no tener acceso a una letrina. Además, el riesgo de ser portador de *E. dispar* aumentaba con la edad del niño.

Los riesgos asociados a *Blastocystis* sp. incluyeron la edad (considerada tanto como una variable lineal como cuadrática), el residir en un área rural, y en menor medida, el contacto directo con patos y el no tener acceso a una letrina. El habitar una vivienda construida con adobe era un factor protector contra la blastocistosis.

### 4.3. Comparación de la situación epidemiológica en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique)

A modo de resumen comparativo, la [Tabla 21](#) muestra los datos más destacados en cuanto a la prevalencia y riesgos asociados de los protistas entéricos objeto de estudio en la población pediátrica ( $n = 2.449$ ) investigada en el municipio de Leganés en España y la provincia de Zambézia en Mozambique.

**Tabla 20.** Distribución de protistas entéricos en la población pediátrica asintomática y sintomática ( $n = 1.093$ ) investigada en la provincia de Zambézia (Mozambique) en función de los factores de riesgo considerados en la encuesta epidemiológica. Análisis multivariante. Los valores con significancia estadística están resaltados en rojo.

Especies parasitarias y variables consideradas	OR	$P > z$	IC 95%
<b><i>Giardia duodenalis</i><sup>a</sup></b>			
Contacto con patos	14,96	0,001	2,9–76,3
Agua bebida río (1º o 2º)			
Sí agua bebida río, sí tratamiento <sup>b</sup>	0,39	0,001	0,2–0,7
Sí agua bebida río, no tratamiento <sup>b</sup>	2,91	0,000	1,8–4,7
No agua bebida río, sí tratamiento <sup>b</sup>	0,07	0,01	0,01–0,5
Diarrea miembro familia	2,59	0,000	1,5–4,4
Contacto con perros	1,92	0,036	1,1–3,5
Contacto con gatos	1,73	0,008	1,2–2,6
Presencia de síntomas clínicos	0,69	0,092	0,5–1,1
Material construcción vivienda (comparado con “otro” <sup>c</sup> )			
Ladrillo	0,19	0,000	0,11–0,3
Adobe	0,36	0,000	0,2–0,5
Madera	0,26	0,000	0,2–0,4
_cons	0,23	0,000	0,1–0,4
Efecto aleatorio: Distrito	0,26	–	0,1–1,2
Efecto aleatorio: Barriada	0,59	–	0,3–1,3
<b><i>Entamoeba dispar</i><sup>a</sup></b>			
Edad	1,13	0,031	1,0–1,3
Origen 1º agua bebida (comparado con agua de red)			
Río	3,63	0,045	1,0–12,8
Pozo	2,27	0,087	0,9–5,8
Presencia de síntomas clínicos	0,21	0,001	0,1–0,5
No letrina	2,93	0,003	1,4–6,0
Contacto con patos	2,87	0,050	1,0–8,2
<i>Blastocystis</i>	3,10	0,000	1,8–5,3
_cons	0,02	0,000	0,0–0,1
Efecto aleatorio: Barriada	0,49	–	0,2–1,5
<b><i>Blastocystis sp.</i><sup>a</sup></b>			
Edad (variable lineal, incremento anual)	2,76	0,008	1,3–5,8
Edad (variable cuadrática, anual)	0,94	0,004	0,9–1,0
Rural comparado con urbano	32,37	0,000	5,5–190,2
Contacto con patos	3,46	0,027	1,2–10,4
Material construcción vivienda (comparado con ladrillo, adobe y “otro” <sup>c</sup> )	0,37	0,000	0,2–0,6
No letrina	2,69	0,027	1,1–6,4
Presencia de síntomas clínicos	0,50	0,068	0,2–1,1
_cons	0,00	0,00	0,00–0,00
Efecto aleatorio: Barriada	2,46	–	0,7–9,0

OR: Cociente de probabilidad; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%;  $P$ : Probabilidad.

<sup>a</sup> Resultados para *Giardia duodenalis* ajustados por distrito y barriada. Resultados para *E. dispar* ajustados por barriada. Resultados para *Blastocystis sp.* ajustados por distrito. <sup>b</sup> Cloración, hervido o ambos. <sup>c</sup> Bloques prefabricados de hormigón y techumbre de paja o placas de zinc.

**Tabla 21.** Prevalencia y riesgos asociados de las especies de protistas entéricos en las poblaciones pediátricas investigadas en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique).

Variable	Leganés (España)	Zambézia (Mozambique)	
	Asintomáticos (n = 1.356)	Asintomáticos (n = 807)	Sintomáticos (n = 286)
Prevalencia (%)			
Cualquier protista	28	54	46
<i>Giardia duodenalis</i>	17	42	42
<i>Entamoeba histolytica</i>	No investigado	0	0
<i>Entamoeba dispar</i>	No investigado	14	2
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	1	1
<i>Blastocystis</i> sp.	14	18	4
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	0	0,4	0
Coinfecciones	4	12	2
Riesgo asociado <sup>a</sup>			
<i>Giardia duodenalis</i>	<i>Blastocystis</i> sp.	Familiar con diarrea, contacto con patos, perros y gatos, vivienda de baja calidad constructiva, consumo de agua de ríos y manantiales	
<i>Entamoeba histolytica</i>	No investigado	Desconocido	
<i>Entamoeba dispar</i>	No investigado	<i>Blastocystis</i> sp., contacto con patos, consumo de agua de ríos y manantiales, no acceso a letrina, edad	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Blastocystis</i> sp., ser niña	Desconocido	
<i>Blastocystis</i> sp.	<i>G. duodenalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp., edad, no lavar frutas y verduras frescas	Contacto con patos, residencia en área rural, no acceso a letrina, edad	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Desconocido	Desconocido	

<sup>a</sup> Determinados a partir de los análisis multivariantes descritos en las secciones 4.1.7. y 4.2.10.

La tasa de parasitación por una o más especies de protistas entéricos era casi el doble en la población pediátrica asintomática mozambiqueña comparada con la española (54% vs. 28%). El porcentaje de infecciones múltiples también era 3 veces superior en los niños de Mozambique que los españoles (12% vs. 4%). Estas diferencias se atribuyeron a la elevada prevalencia de *G. duodenalis* hallada en Mozambique, puesto que las tasas de infección por *Cryptosporidium* spp. (1% vs. 1%), *Blastocystis* sp. (14% vs. 18%) y *E. bieneusi* (0% vs. 0,3%) en las poblaciones pediátricas comparadas eran similares.

Respecto a los riesgos asociados a las infecciones por estos microorganismos, la aparición de una especie concreta estaba ligada a la presencia de otras especies. Este efecto era particularmente evidente en la población pediátrica analizada en España, pero también ocurría, aunque en menor medida, en Mozambique. En este último país es destacable la

evidencia hallada de transmisión persona-persona (mediante el contacto con familiares con diarrea) o animal-persona (mediante el contacto con animales domésticos, principalmente patos). La evidencia de transmisión de origen hídrico, particularmente asociada al consumo de agua no tratada proveniente de ríos y manantiales, era también muy sólida. También es relevante el marcado patrón de distribución de *E. dispar* y *Blastocystis* sp. directamente proporcional a la edad de los niños infectados.

#### 4.4. Epidemiología molecular en Leganés, España

Para el estudio de diversidad y frecuencia de genotipos y subgenotipos de las 3 especies de protistas entéricos (*G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* sp.) hallados en la población pediátrica asintomática reclutada en Leganés se analizaron un total de 1.512 muestras de heces. Esta cifra incluía las 1.326 muestras de heces de los niños de 4 a 14 años que participaron en el estudio de asociación de riesgos y 156 muestras adicionales de heces de hermanos o primos con edades comprendidas entre 1 y 16 años y residentes todos ellos en el municipio de Leganés (ver sección 4.1.1.). El 6% (10/156) de los niños de este último grupo declararon tener diarrea en los 7 días previos a la recogida de las muestras. Los resultados presentados en esta sección han sido publicados en la referencia [Muadica et al. \(2020b\)](#).

##### 4.4.1. Diversidad genética en *Giardia duodenalis*

La presencia de *G. duodenalis* fue confirmada mediante qPCR en el 17% (263/1.512) de las muestras analizadas. Los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos en las reacciones de amplificación oscilaron entre 18–41 (mediana: 34; percentil 25: 31; percentil 75: 35). El 81% (213/263) de las muestras positivas a *G. duodenalis* tenían valores de Ct  $\geq$  30. En base a los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos moleculares en poblaciones pediátricas asintomáticas y sintomáticas españolas previamente realizados por el LRIP del CNM ([Mateo et al., 2014](#); [de Lucio et al., 2015](#); [Azcona-Gutiérrez et al., 2017](#)), solamente se analizaron mediante MLST aquellas muestras con valores de Ct < 30 ( $n = 50$ ).

De las 50 muestras investigadas por MLST, el 42% (21/50), 18% (9/50) y 24% (12/50) fueron amplificadas con éxito en los marcadores genéticos *gdh*, *bg*, y *tpi*, respectivamente. El 48% (24/50) de estas muestras fueron genotipadas y/o subgenotipadas por al menos uno de los 3 marcadores genéticos mencionados. El 12% (6/50) de las muestras fueron caracterizadas por los 3 marcadores genéticos usados ([Tabla 22](#)). El análisis de las secuencias generadas a partir de los productos de amplificación obtenidos en *gdh*, *bg* o *tpi* revelaron la presencia de los *assemblages* A (17%, 4/24) y B (83%, 20/24). Todas las secuencias pertenecientes al *assemblage* A fueron identificadas como sub-*assemblage* All. De las 20 secuencias

pertenecientes al *assemblage* B, 18 fueron identificadas como sub-*assemblage* BIV, mientras que las 2 secuencias restantes correspondía a un resultado ambiguo BIII/BIV y a un aislado identificado sólo a nivel de *assemblage*. No se identificaron infecciones mixtas A+B. Tampoco se hallaron variantes genéticas de *G. duodenalis* específicamente adaptadas a infectar cánidos (*assemblages* C y D), félidos (*assemblage* F) o rumiantes (*assemblage* E).

**Tabla 22.** Caracterización molecular de las muestras positivas a *Giardia duodenalis* ( $n = 24$ ) en los marcadores genéticos *gdh*, *bg* y *tpi* obtenidas en la población escolar del municipio de Leganés (Madrid, España).

Código muestra	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	Genotipo asignado
125	No amplifica	No amplifica	BIV	BIV
384	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
507	All	All	All	All
554	BIV	B	BIV	BIV
566	BIV	No amplifica	BIV	BIV
579	BIV	No amplifica	BIV	BIV
737	All	All	All	All
764	No amplifica	B	No amplifica	B
823	BIV	No amplifica	BIV	BIV
980	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
991	BIV	No amplifica	BIV	BIV
1030	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
1435	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
1459	BIV	B	No amplifica	BIV
1662	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
1721	BIV	B	BIV	BIV
1777	No amplifica	No amplifica	BIV	BIV
1784	BIV	B	No amplifica	BIV
1821	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
1904	BIV	No amplifica	No amplifica	BIV
1991	All	All	All	All
1997	All	No amplifica	No amplifica	All
2041	BIV	B	BIV	BIV
2172	BIII/BIV	No amplifica	No amplifica	BIII/BIV

*bg*: Beta-giardina; *gdh*: Glutamato deshidrogenasa; *tpi*: Triosa fosfato isomerasa.

La diversidad genética de *G. duodenalis* observada en el análisis detallado de las secuencias nucleotídicas generadas a partir de los marcadores *gdh*, *bg* y *tpi* se muestra de forma resumida en la [Tabla 23](#). En el locus *gdh*, 3 de las 4 secuencias identificadas como All eran idénticas a la secuencia de referencia L40510. La secuencia All restante difería de L40510 en un único polimorfismo de nucleótido único (SNP) en posición 269 (doble pico C/T). Comparativamente, una diversidad genética mayor fue observada entre las 16 secuencias asignadas de forma inequívoca al sub-*assemblage* BIV de *G. duodenalis*, que diferían entre 1 y 4 SNPs con la secuencia de referencia L40508.

**Tabla 23.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Giardia duodenalis* generadas a partir de los marcadores *gdh*, *bg* y *tpi* en la población escolar del municipio de Leganés (Madrid, España). Se indican los números de acceso a GenBank. Los polimorfismos de nucleótido único implicados en cambio de aminoácido están señalados por letras en superíndice indicando en aminoácido afectado en la cadena proteica.

Marcador	Assemblage	Sub-Assemblage	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	GenBank ID
<i>gdh</i>	A	All	3	L40510	64-496	Ninguno	MN844134
			1		76-491	T269Y <sup>a</sup>	MN844135
	B	BIV	6	L40508	76-491	Ninguno	MN844136
			1		76-496	C102Y, C105Y, C432Y, C435Y	MN844137
			1		78-485	C126Y	MN844138
			5		76-441	T183C, T387C, C396T, C423T	MN844139
			2		76-482	T183Y, T387Y, C396Y, C423Y	MN844140
			1		76-496	T183Y, T387Y, C423Y	MN844141
			1	L40508	76-496	C85Y <sup>b</sup> , T135Y, T183Y, G186R, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387Y, A438R, G453R	MN844142
			3	AY072723	96-604	Ninguno	MN844143
<i>bg</i>	A	All	3	AY072723	93-593	G159A, C165T, C309T, C324T, C393T, T471C	MN844144
	B	B	3	AY072727	102-590	G159A, C165T, A265R <sup>c</sup> , C309T, C324T, C393T, T471C	MN844145
			1		93-604	G159A, C165T, C309T, C324T, C352T <sup>d</sup> , C393T, T471C	-
			1		102-604	G159A, C165T, C309T, C324T, C372T, C393T, T471C	MN844146
			2	U57897	282-751	Ninguno	MN844147
			1		276-805	C287G, A291W <sup>e</sup>	MN844148
			7	AF069560	1-479	Ninguno	MN844149
			1		1-479	A201R <sup>f</sup>	MN844150
			1		1-479	G305A, G425A, G426A <sup>g</sup>	MN844151
			1		1-479	G305A, G425A, G426A <sup>g</sup>	MN844151

<sup>a</sup> Si C, pM90T; <sup>b</sup> Si T, pP29S; <sup>c</sup> Si G, pK89E; <sup>d</sup> Codón de parada; <sup>e</sup> Si T, pN95Y; <sup>f</sup> Si G, pT74A; <sup>g</sup> pE143K; R: A/G; W: A/T; Y: C/T.

De las 16 secuencias BIV, 6 eran idénticas a la secuencia de referencia L40508, 5 contenían mutaciones transicionales C↔T en posiciones 183, 387, 396 y 423 y las restantes 5 secuencias presentaban diversas posiciones heterocigóticas, incluyendo las ya mencionadas, en forma de dobles picos (mayoritariamente C/T, pero también A/G) claramente visibles en los correspondientes cromatogramas. No se identificaron mutaciones causantes de transversiones A↔C, G↔T, A↔T o C↔G. También se identificó una secuencia con un resultado discordante BIII/BIV que difería en 12 SNPs (todos ellos dobles picos) con la secuencia de referencia L40508, y que muy probablemente representaba una infección mixta BIII+BIV. Algunas de las posiciones ambiguas identificadas (T269Y en AII y C85Y en BIII/BIV) podrían estar implicadas en cambios de aminoácido en la cadena proteica (Tabla 23).

En el locus *bg*, los resultados obtenidos eran muy similares a los observados en *gdh*. Las 3 secuencias identificadas como AII eran idénticas a la secuencia de referencia AY072723. Por el contrario, las 6 secuencias asignadas al ensamblaje B de *G. duodenalis* mostraban 6–7 SNPs en comparación con la secuencia de referencia AY072727. La gran mayoría de estas secuencias presentaban un patrón definido de SNPs en las que las posiciones 159 (G/A), 165 (C/T), 309 (C/T), 324 (C/T), 393 (C/T) y 471 (T/C) eran predominantes. Al contrario que en *gdh*, tan solo uno de los SNPs identificados representaba una posición ambigua en la forma de doble pico A/G potencialmente asociada a cambio de aminoácido en la cadena proteica (Tabla 23). No se identificaron mutaciones causantes de transversiones.

En el locus *tpi*, la diversidad genética hallada era comparativamente menor que la descrita anteriormente para los marcadores *gdh* y *bg*. De las 4 secuencias identificadas como AII 3 eran idénticas a la secuencia de referencia U57897, mientras que la restante difería de ella en dos SNPs en posiciones 287 (transversión C/G) y 291 (A/W). El doble pico (A/T) de este último podría estar asociado a cambio de aminoácido en la cadena polipeptídica de *tpi*. Así mismo, 7 de las 9 secuencias identificadas como BIV presentaban una identidad del 100% con la secuencia de referencia AF069560. Las 2 secuencias restantes diferían de AF069560 en 1–3 SNPs y ambas incluían posiciones implicadas en sustituciones de aminoácidos (Tabla 23).

#### 4.4.2. Diversidad genética en *Cryptosporidium* spp.

La presencia de *Cryptosporidium* spp. fue confirmada mediante *ssu* rARN-PCR en el 1% (14/1.512) de las muestras investigadas. El análisis de las 14 secuencias generadas en este marcador reveló la presencia de 2 especies de *Cryptosporidium* circulando en la población escolar objeto de estudio: *C. hominis* (71%; 10/14) y *C. parvum* (22%; 3/14). Una secuencia adicional (7%, 1/14) sólo pudo ser caracterizada a nivel de género debido a la insuficiente

calidad de las secuencias obtenidas en las sucesivas reacciones de amplificación que se intentaron con esta muestra (Tabla 24).

De las 10 secuencias identificadas como *C. hominis*, 5 de ellas eran idénticas a la secuencia de referencia AF108865. Las 5 secuencias restantes mostraban una variabilidad genética considerable, difiriendo entre 1 a 4 SNPs con AF108865. Estos cambios incluían transiciones (C/T y A/G) y transversiones (G/T), inserciones y deleciones múltiples (Tabla 24). Ninguna de estas muestras pudo ser amplificada utilizando el gen de copia única *gp60* como marcador, por lo que su subgenotipo es desconocido.

De las 3 secuencias identificadas como *C. parvum*, 2 de ellas presentaban una identidad del 98% con la secuencia de referencia AF112571, pero su calidad era insuficiente para determinar con exactitud la presencia de SNPs. Una de ellas pudo ser posteriormente amplificada por *gp60*-PCR y la secuencia asociada al amplicón obtenido permitió confirmar su pertenencia a la familia IId del parásito. La tercera secuencia, de excelente calidad, fue asignada al “genotipo bovino” de *C. parvum* (Tabla 24). Esta variante genética ha sido propuesta como especie independiente (*Cryptosporidium pestis*) por Slapeta (2006). Sin embargo, debido a la escasa acogida de la comunidad científica, y para evitar confusiones innecesarias, en el presente trabajo se ha preferido mantener la nomenclatura clásica antes mencionada.

**Tabla 24.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Cryptosporidium* spp. generadas a partir del marcador *ssu* rARN en la población escolar del municipio de Leganés (Madrid, España). Se indican los números de acceso a GenBank.

Especie	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	GenBank ID
<i>C. hominis</i>	5	AF108865	572–994	Ninguno	MN836820
	2		606–938	C607T, C620T	MN836821
	1		589–985	C607T, C620T, 697insT <sup>a</sup> , G862T	MN836822
	1		536–949	695_697delTTT <sup>b</sup> , T795C	MN836823
	1		687–952	A855G	MN836824
<i>C. parvum</i>	2	AF112571	603–877	Desconocido <sup>c</sup>	–
	1		535–1025	A646G, T648C, T649G, 686-689delTAAT <sup>b</sup> , A691T, T910C	MN836825
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	–	–	–	–

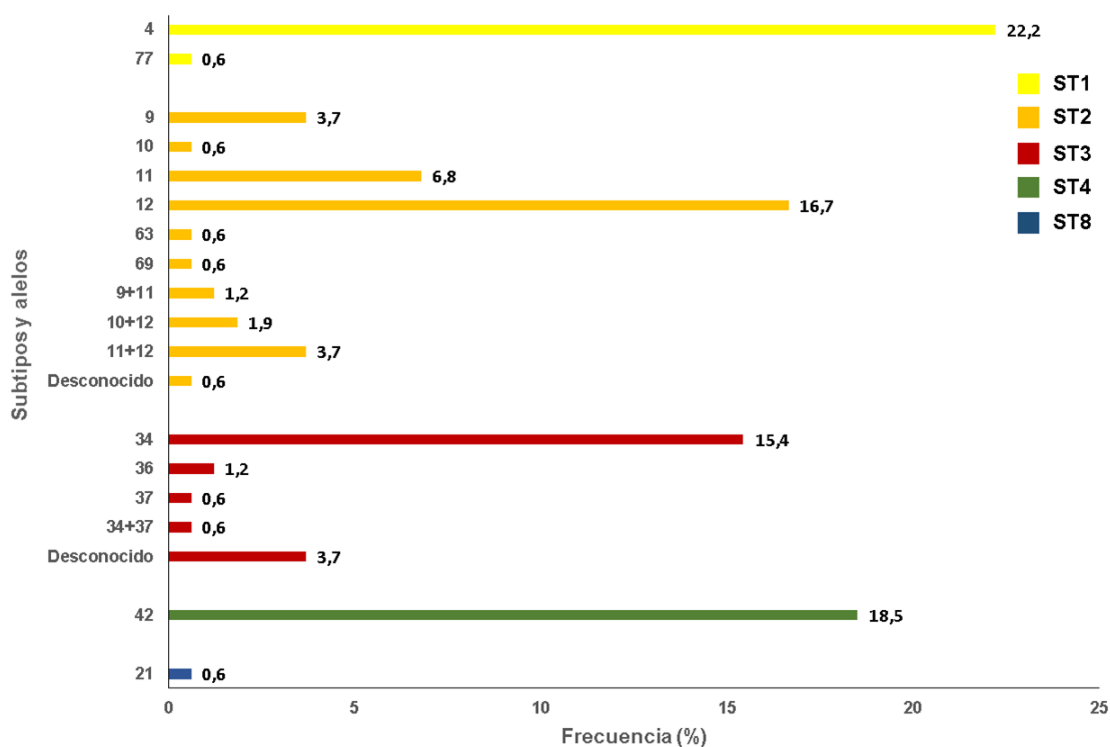
<sup>a</sup> ins: Inserción de nucleótido; <sup>b</sup> del: Delección de nucleótido(s); <sup>c</sup> Secuencia de calidad insuficiente para determinar polimorfismo de nucleótido único.

Ninguno de los SNPs detectados en las secuencias de *C. hominis* o *C. parvum* analizadas presentaban posiciones ambiguas asociadas a dobles picos en el correspondiente cromatograma.

#### 4.4.3. Diversidad genética en *Blastocystis* sp.

La presencia de *Blastocystis* sp. fue determinada mediante *ssu* rARN-PCR en el 13% (197/1.512) de las muestras investigadas. De ellas, el 82% (162/197) fueron genotipadas con éxito. Las restantes 35 muestras generaron secuencias de baja calidad o ilegibles, típicamente asociadas a bandas tenues en el gel de agarosa tras la separación electroforética. No es totalmente descartable que algunas de estas muestras no confirmadas mediante secuenciación correspondan a amplificaciones inespecíficas.

El análisis de las 162 secuencias generadas a partir del marcador *ssu* rARN permitió identificar la presencia de 5 subtipos (ST) de *Blastocystis* incluyendo ST1 (23%; 37/162), ST2 (36%; 59/162), ST3 (22%; 35/162), ST4 (19%; 30/162), y ST8 (1%; 1/162) (Figura 26).



**Figura 26.** Frecuencia y diversidad genética de las secuencias de *Blastocystis* sp. generadas a partir del marcador *ssu* rARN en la población escolar del municipio de Leganés (Madrid, España). Se indican los subtipos y alelos del microorganismo hallados.

No se hallaron infecciones mixtas implicando diferentes subtipos de este protista. Tampoco se detectó la presencia de STs considerados como especialmente adaptados a colonizar/infectar especies animales no humanas (ST10-ST17, ST21, ST23-ST26).

Respecto a la diversidad intra-subtipo, la mayor variabilidad genética fue hallada en ST2, en el que se identificaron 6 alelos presentes en forma única (alelos 9, 10, 11, 12, 63 y 69). De forma destacable, el análisis pormenorizado de los cromatogramas permitió hallar posiciones ambiguas (dobles picos) en varias secuencias compatibles con infecciones mixtas de alelos 9+11, 10+12, y 11+12 (Figura 26). Dentro de ST3 se encontraron 3 alelos presentes en forma única (alelos 34, 36 y 37) y una infección mixta por alelos 34+37. Por el contrario, sólo los alelos 4 y 77 fueron descritos en ST1, el alelo 42 en ST4 y el alelo 21 en ST8. Un total de 7 secuencias (1 en ST2 y 6 en ST3) no pudieron ser estudiadas a nivel alélico debido a la insuficiente calidad o longitud de éstas (Figura 26).

### 4.5. Epidemiología molecular en Zambézia, Mozambique

Para el estudio de diversidad y frecuencia de genotipos y subgenotipos de las 4 especies de protistas entéricos (*G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp. y *E. bieneusi*) hallados en la población pediátrica asintomática y sintomática reclutada en Zambézia se analizaron el total de las 1.093 muestras de heces de niños de 3 a 14 años que participaron en el estudio de asociación de riesgos (ver secciones 4.2.1. y 4.2.3.). Las muestras positivas a *E. dispar* no fueron genotipadas debido a la ausencia de protocolos estandarizados para tal fin en el LRIP del CNM. Los resultados presentados en esta sección han sido parcialmente publicados en la referencia Muadica *et al.* (2020c).

#### 4.5.1. Diversidad genética en *Giardia duodenalis*

La presencia de *G. duodenalis* fue confirmada mediante qPCR en el 42% (456/1.093) de las muestras analizadas. Los valores de Ct obtenidos en las reacciones de amplificación oscilaron entre 18–42 (mediana: 32; percentil 25: 27; percentil 75: 35) (Tabla 25). El 46% (209/456) de las muestras positivas a *G. duodenalis* tenían valores de Ct  $\geq$  32. En base a los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos moleculares en poblaciones pediátricas de áreas endémicas en África (Flecha *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2016a; Dacal *et al.*, 2018), Asia (Kasaei *et al.*, 2018; Rafiei *et al.*, 2020) y Sudamérica (Seguí *et al.*, 2018) previamente realizados por el LRIP del CNM, solamente se analizaron mediante MLST aquellas muestras con valores de Ct < 32 ( $n = 247$ ).

Tomando ventaja de que la qPCR es un método semi-cuantitativo que permite estimar de forma aproximada la cantidad de ADN parasitario presente en la reacción de partida, se compararon los valores de Ct obtenidos entre los lotes de muestras cuyos ADN genómicos fueron extraídos y purificados en el LRIP del CNM o *in situ* en Zambézia (ver sección 4.2. y Tabla 25). Este análisis permitió evaluar de forma indirecta el impacto de los procedimientos de conservación, transporte y almacenamiento de las muestras de heces (desde su recogida en Mozambique hasta su procesamiento en España) sobre la calidad final del ADN molde. Así, la mediana de los valores de Ct en el lote 1 (procesamiento en España) era de 32, mientras que en el lote 2 (procesamiento en Mozambique) era de 30 (Tabla 25). Teniendo en cuenta que cada 3 ciclos de amplificación la cantidad de ADN molde aumenta en un orden de magnitud, estos datos indican que la extracción y purificación de ADN *in situ* producía material genómico en mayor cantidad y calidad para uso molecular.

**Tabla 25.** Valores de ciclo umbral obtenidos en los niños positivos a *Giardia duodenalis* mediante qPCR en la provincia de Zambézia (Mozambique).

Estadístico	Niños asintomáticos		Niños sintomáticos	Total <i>n</i> = 456
	Lote 1 <sup>a</sup> ( <i>n</i> = 248)	Lote 2 <sup>b</sup> ( <i>n</i> = 88)	Lote 1 <sup>a</sup> ( <i>n</i> = 120)	
Rango	18–42	20–40	20–41	18–42
Mediana	32	30	31	32
Percentil 25	28	25	27	27
Percentil 75	35	34	34	35

<sup>a</sup> Extracciones de ADN genómico realizadas en el LRIP del CNM, España; <sup>b</sup> Extracciones de ADN genómico realizadas *in situ* en Zambézia.

De las 247 muestras investigadas por MLST, el 16% (39/247), 10% (25/247) y 6% (15/247) fueron amplificadas con éxito en los marcadores genéticos *gdh*, *bg*, y *tpi*, respectivamente. El 17% (43/247) de estas muestras fueron genotipadas y/o subgenotipadas por al menos uno de los 3 marcadores genéticos mencionados. El 4% (10/247) de las muestras fueron caracterizadas por los 3 marcadores genéticos analizados (Tabla 26). El 93% (40/43) de las muestras genotipadas o subgenotipadas formaban parte del lote de muestras de niños asintomáticos cuyos ADN genómicos fueron extraídos *in situ* en Zambézia (Tabla 25). El análisis de las secuencias generadas a partir de los productos de amplificación obtenidos en *gdh*, *bg* o *tpi* revelaron la presencia de los *assemblages* A (7%, 3/43) y B (88%, 38/43). Dos secuencias (5%, 2/43) fueron identificadas como infecciones mixtas A+B. Todas las secuencias pertenecientes al *assemblage* A fueron identificadas como sub-*assemblage* All. De las 40 secuencias pertenecientes al *assemblage* B, el 13% (5/40) fueron identificadas como sub-*assemblage* BIII, el 20% (8/40) como sub-*assemblage* BIV y el 50% (20/40) correspondían a resultados ambiguos BIII/BIV.

**Tabla 26.** Caracterización molecular de las muestras positivas a *Giardia duodenalis* ( $n = 43$ ) en los marcadores genéticos *gdh*, *bg* y *tpi* obtenidas en la población pediátrica de la provincia de Zambézia (Mozambique).

Código muestra	<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	Genotipo asignado
4	BIV	Negativo	Negativo	BIV
17	BIV	Negativo	Negativo	BIV
24 <sup>a</sup>	BIV	Negativo	Negativo	BIV
57	BIV	Negativo	Negativo	BIV
62	All	Negativo	All	All
67	BIII/BIV	Negativo	Negativo	BIII/BIV
69	BIV	B	BIII	BIII/BIV
70	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
74	BIII	B	Negativo	BIII
79	All	Negativo		All
88	BIII/BIV	Negativo	BIII	BIII/BIV
97	BIV		Negativo	BIV
100	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
103	BIII/BIV	Negativo	Negativo	BIII/BIV
104	BIII/BIV	B	BIII	BIII/BIV
105	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
118	BIV	B	Negativo	BIV
122	BIII/BIV	B	BIII/BIV	BIII/BIV
124	Negativo	B	Negativo	B
128	Negativo	B	Negativo	B
140	Negativo	B	Negativo	B
141	BIII	B	BIII/BIV	BIII/BIV
143	BIII	Negativo	Negativo	BIII
164	All	All	All	All
165	BIII	B	Negativo	BIII
170	BIII/BIV	Negativo	Negativo	BIII/BIV
172	All	B	Negativo	All+B
173	BIV	Negativo	Negativo	BIV
175	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
176	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
178	BIV	Negativo	Negativo	BIV
179	BIII/BIV	Negativo	Negativo	BIII/BIV
180	BIII/BIV	B	All	All+BIII/BIV
183	Negativo	B	Negativo	B
186	BIII/BIV	Negativo	BIII	BIII/BIV
187	BIII	Negativo	BIII	BIII
190	BIII/BIV	B	BIII	BIII/BIV
191	Negativo	B	Negativo	B
194	BIII/BIV	B	BIII	BIII/BIV
195	BIII/BIV	B	BIII	BIII/BIV
196	Negativo	Negativo	BIII	BIII
203	BIII/BIV	B	Negativo	BIII/BIV
206	BIII/BIV	B	BIII	BIII/BIV

*bg*: Beta-giardina; *gdh*: Glutamato deshidrogenasa; *tpi*: Triosa fosfato isomerasa. <sup>a</sup> Niño sintomático.

Cinco secuencias adicionales (13%) no pudieron ser caracterizadas a nivel de sub-*assemblage*. De las dos secuencias que formaban parte de coinfecciones una fue asignada al *assemblage* B (2%) y la otra a BIII/BIV (2%). La diversidad genética de *G. duodenalis* observada en el análisis detallado de las 38 secuencias nucleotídicas generadas a partir del marcador *gdh* se muestra de forma resumida en la [Tabla 27](#). En este locus, las 4 secuencias identificadas como AII eran idénticas a la secuencia de referencia L40510.

Por el contrario, se observó un elevadísimo grado de diversidad genética en las secuencias pertenecientes al *assemblage* B. Virtualmente, todas las secuencias BIII, BIV y BIII/BIV generadas diferían entre ellas en al menos un SNP. Todas las sustituciones halladas correspondían a transiciones C $\leftrightarrow$ T o A $\leftrightarrow$ G. Las 5 secuencias asignadas a BIII diferían entre 1 y 9 SNPs con la secuencia de referencia AF069059. La mayoría de estas variaciones correspondían a posiciones heterocigóticas asociadas a dobles picos (mayoritariamente C/T, pero también A/G) a nivel del cromatograma. Los SNPs más frecuentes se situaban en posiciones 99, 147, 150, 309 y 336, preferentemente en forma de dobles picos C/T ([Tabla 27](#)).

Las 9 secuencias identificadas como BIV diferían entre 2 y 8 SNPs con la secuencia de referencia L40508. De ellas, 6 secuencias presentaban sustituciones claras de nucleótidos en sus secuencias (principalmente transiciones C $\leftrightarrow$ T en las posiciones 183, 387, 396 y 423), pero no posiciones ambiguas (dobles picos). Las 3 secuencias restantes presentaban tanto mutaciones como dobles picos en diferentes proporciones ([Tabla 27](#)).

Las 20 secuencias identificadas como resultados ambiguos BIII/BIV, todas ellas distintas entre sí, diferían además entre 5 y 15 SNPs con la secuencia de referencia L40508. La principal particularidad de estas secuencias era la presencia mayoritaria de dobles picos C/T, y en menor medida A/G, en todas ellas. Los SNPs asociados a sustituciones transicionales C $\leftrightarrow$ T o A $\leftrightarrow$ G eran minoritarios o inexistentes. Ninguno de ellos estaba asociado a cambio de aminoácido en la cadena proteica. En muchas de estas secuencias se identificaron de forma conjunta dobles picos en posiciones típicas de secuencias BIII (99, 147, 150, 309 y 336) y BIV (183, 387, 396 y 423) indicando que probablemente (pero no con certeza absoluta) correspondían a infecciones mixtas BIII+BIV ([Tabla 27](#)). Estas posiciones eran invariables independientemente de la secuencia de referencia elegida (AF069059 para BIII y L40508 para BIV) ya que el alineamiento de ambas es común en sus primeros nucleótidos.

**Tabla 27.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Giardia duodenalis* generadas a partir del marcador *gdh* en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique). Los polimorfismos de nucleótido único implicados en cambio de aminoácido están señalados por letras en superíndice indicando el aminoácido afectado en la cadena proteica.

Assemblage	Sub-Assemblage	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	Código muestra
A	All	4	L40510	68-497	Ninguno	164
B	BIII	1	AF069059	40-460	C64Y <sup>a</sup> , C87Y, C99Y, T147C, G150R, C309Y, C336Y, G402R, T456Y	141
		1		40-460	C69Y, C99Y, T147Y, G150R, C309Y, C336Y, T456Y	74
		1		40-455	C69Y, T147Y, C336Y, G402R, T426Y	165
		1		40-460	T147Y, T219C, C330Y, G381A, G402R	187
		1		40-460	C309T	143
		1	L40508	76-491	C111Y, T183C, C345Y, T366C, T387C, C396Y, C423Y, A438R	69
BIV		1		76-491	T135C, T183C	178
		1		76-496	T183C, C291Y, T366Y, T387C, C423Y, C432Y	173
		1		76-496	T183C, T336C, T387C, C396T, C423T	17
		1		76-491	T183Y, C345Y, T366Y, T387C	97
		1		76-496	T183C, T387C	57
		1		76-480	T183C, T387C, C396T, C423T	4
		1		76-422	G276A, C327T	118
		1		76-484	T183C, T387C, C396T, C423T	24
BIII/BIV		1	L40508	76-491	G84R, C126Y, T135Y, C255Y, C273Y, T366Y, T387C, C423Y, C432Y, A438R	122
		1		76-491	G93R, C123Y, T135Y, T183Y, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387Y, A438R	194
		1		76-491	C105T, T135Y, T183Y, C255Y, C273T, C345Y, T366C, C372Y, T387C, A438R	103
		1		76-496	C105Y, T148Y <sup>b</sup> , T183C, G186R, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, C372Y, G384R, T387C, C396Y, C432Y, A438R	175
		1		76-491	T135Y, C159Y, T183Y, C255Y, C273Y, C300Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387C, C396Y, A438R	100
		1		76-491	T135Y, A166R <sup>c</sup> , T183C, G186R, C240Y, C255Y, C273Y, T366Y, C372Y, T387C, C396Y, A438R	176

<sup>a</sup> Si T, pL22F; <sup>b</sup> Si C, pF50L; <sup>c</sup> Si A, pN56D; <sup>d</sup> Si A, pE148K; <sup>e</sup> Si C, pM63T; <sup>f</sup> Si G, pQ121R; <sup>g</sup> Si A, pG151R.

**Tabla 27 (continuación).** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Giardia duodenalis* generadas a partir del marcador *gdh* en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique). Los polimorfismos de nucleótido único implicados en cambio de aminoácido están señalados por letras en superíndice indicando el aminoácido afectado en la cadena proteica.

Assemblage	Sub-Assemblage	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	Código muestra
1		1	76-491		T135Y, C168Y, T183C, G186R, C255Y, G261R, C273Y, T312Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387C, G408R, A438R, G442R <sup>d</sup>	180
1		1	76-491		T135Y, C168Y, T183C, G186R, C255Y, G261R, C273T, T312Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387C, G417R, A438R	170
1		1	76-491		T135Y, T183Y, G186R, T188Y <sup>e</sup> , C255Y, C273Y, C345Y, A362R <sup>f</sup> , T366Y, C372Y, T387C, C423Y, A438R, A450R, G451R <sup>g</sup>	179
1		1	76-496		T135Y, T183C, G186R, C255Y, C273Y, G294R, C345Y, T366Y, T387C, G417R, A438R	67
1		1	76-436		T135Y, T183C, A187R, C255Y, T387C, C423T	203
1		1	76-491		T135Y, T183Y, C255Y, C273Y, T366C, T387Y, A438R	206
1		1	76-491		T135Y, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387Y, A438R	195
1		1	76-491		T135Y, T366Y, T387C, C423Y, A438R	190
1		1	76-496		T135Y, T366Y, T387C, C423Y, A438R, G442R	186
1		1	76-491		G156R, T183C, G186R, C255Y, C273T, T312Y, C345Y, T366Y, C372Y, T387C, A438R	88
1		1	76-491		T183Y, G186R, C192Y, C255Y, C273Y, G294R, C345Y, T366Y, C372Y, C387Y, A438R	70
1		1	76-491		T183Y, G186R, G201R, C255Y, C273Y, T312Y, C345Y, T366Y, C372Y, C387C, C432Y, A438R	104
1		1	76-491		T183Y, G186R, G201R, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, C372Y, C387C, C432Y, A438R	105
1		1	76-491		T183C, G186R, C255Y, C273Y, C345T, T366Y, C372Y, C387C, C396Y, C423Y, A438R	57

<sup>a</sup> Si T, pL22F; <sup>b</sup> Si C, pF50L; <sup>c</sup> Si G, pN56D; <sup>d</sup> Si A, pE148K; <sup>e</sup> Si C, pM63T; <sup>f</sup> Si G, pQ121R; <sup>g</sup> Si A, pG151R.

Finalmente, algunos dobles picos detectados en secuencias BIII (C64Y) y BIII/BIV (T148Y, A166R, T188Y, A362R, G442R y 451R) estaban potencialmente ligados a cambio de aminoácido en la cadena polipeptídica de *gdh*, pero no las mutaciones transicionales (C $\leftrightarrow$ T o A $\leftrightarrow$ G) detectadas en las secuencias BIV o BIII/BIV (Tabla 27).

La diversidad genética de *G. duodenalis* observada en el análisis detallado de las 25 secuencias nucleotídicas generadas a partir del marcador *bg* se muestra de forma resumida en la Tabla 28. En este locus, la única secuencia identificadas como AII era idéntica a la secuencia de referencia AY072723. Un mayor grado de diversidad genética fue hallado en las 24 secuencias asignadas al assemblage B del parásito, aunque en ningún modo comparable a la observada en el marcador *gdh*. De ellas, 4 secuencias eran idénticas a la secuencia de referencia AY072727. Las restantes 20 secuencias diferían de esta última entre 1 y 5 SNPs. Las posiciones tendentes a acumular un mayor número de cambios (tanto en forma de sustituciones transicionales C $\leftrightarrow$ T o A $\leftrightarrow$ G como de dobles picos) fueron las situadas en las posiciones 183, 309, 519 y 564 de AY072727. Varios SNPs involucrando dobles picos y una mutación por transversión C/A en posición 450 estaban implicados en cambio de aminoácido en la cadena proteica de beta-giardina. Tres de ellos se concentraban en la secuencia con código de muestra 195 (Tabla 28).

La diversidad genética de *G. duodenalis* observada en el análisis detallado de las 15 secuencias nucleotídicas generadas a partir del marcador *tpi* se muestra de forma resumida en la Tabla 29. De las 3 secuencias asignadas a AII, 2 de ellas variaban entre 1 y 2 SNPs con la secuencia de referencia U57897. Ambas secuencias portaban una mutación por transversión C/G en posición 287. La tercera secuencia carecía de calidad suficiente para determinar la presencia de posibles SNPs. Las 10 secuencias identificadas como BIII mostraban entre 1 y 8 SNPs de diferencia con la secuencia de referencia AF069561. De ellas, 6 incluían exclusivamente mutaciones transicionales C $\leftrightarrow$ T o A $\leftrightarrow$ G y las 4 secuencias restantes exclusivamente posiciones ambiguas en forma de dobles picos. Los SNPs identificados tendían a acumularse en las posiciones 34, 108 y 141. Tres de ellos (C34T, C43T y C214T) estaban asociados a cambios en la secuencia aminoacídica del enzima triosa fosfato isomerasa. Una de las secuencias presentaba una inserción (C) en posición 354 (Tabla 29). Las dos secuencias identificadas con un resultado ambiguo BIII/BIV diferían en 7 SNPs con la secuencia de referencia AF069560. La mayoría de ellos correspondían a dobles picos C/T o A/G a nivel de cromatograma. Uno de ellos (T57C) inducía cambio de aminoácido en la cadena polipeptídica. Ninguna de las secuencias BIII o BIII/BIV identificadas presentaban transversiones de nucleótidos.

**Tabla 28.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Giardia duodenalis* generadas a partir del marcador *bg* en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique). Los polimorfismos de nucleótido único implicados en cambio de aminoácido están señalados por letras en superíndice indicando el aminoácido afectado en la cadena proteica.

<b>Assemblage</b>	<b>Sub-Assemblage</b>	<b>Muestras (n)</b>	<b>Secuencia de referencia</b>	<b>Distancia</b>	<b>Polimorfismo de nucleótido único</b>	<b>Código muestra</b>
A	All	1	AY072723	97-593	Ninguno	164
B	-	4	AY072727	100-753	Ninguno	104
-	-	1		94-592	G165Y, A183R, C309T	141
-	-	1		102-590	C165T, A228W <sup>a</sup> , C309T, A323W <sup>b</sup> , A497R <sup>c</sup>	195
-	-	2		102-592	C165T, C309T	140
-	-	2		102-593	A183G	176
-	-	1		102-590	A183G, G261R, C309T	206
-	-	4		102-593	A183G, C309T, T519C, C564T	70
-	-	1		102-592	A183G, C309Y, C333Y, T519Y, C564Y	122
-	-	1		102-593	A183G, C309T, T519Y, C564Y	100
-	-	2		102-590	A183R, C309Y, T519Y, C564Y	69
-	-	1		102-590	A183G, C450A <sup>d</sup>	183
-	-	1		99-590	C204A, C309T	203
-	-	1		98-592	T519C, C564T	74
-	-	1		98-590	C564Y	180
-	-	1		103-590	A575R <sup>e</sup>	175

<sup>a</sup> Si T, pE76D; <sup>b</sup> Si T, pD108V; <sup>c</sup> Si G, pE166G; <sup>d</sup> pN150K; <sup>e</sup> Si G, pE192G.

**Tabla 29.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Giardia duodenalis* generadas a partir del marcador *tpi* en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique). Los polimorfismos de nucleótido único implicados en cambio de aminoácido están señalados por letras en superíndice indicando el aminoácido afectado en la cadena proteica.

Assemblage	Sub-Assemblage	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	Código muestra
A	All	1	U57897	276-805	C287G	62
		1		276-804	C287G, A291W <sup>a</sup>	164
		1		-	Desconocido <sup>b</sup>	180
B	BIII	1	AF069561	1-431	C34T <sup>c</sup> , C43T <sup>d</sup> , C108T, C337T	187
		1		1-456	C34Y <sup>e</sup> , G105R, C108Y, C141Y, G189R, C324Y, A426R, C447Y	194
		1		1-456	C34Y <sup>e</sup> , C108Y, C141Y, G189R	206
		1		1-456	C34Y <sup>e</sup> , C108Y, C141Y, G189R, C214Y <sup>f</sup> , A240R, T276Y, A426R	69
		1		1-456	C34T <sup>c</sup> , C108T, T291C	186
		1		1-456	C34Y <sup>e</sup> , C108Y, T291Y	190
		1		1-456	C108T, C111T, C141T, C148T, 354delC <sup>g</sup>	196
		1		1-456	C108T, C141G <sup>h</sup>	104
		1		1-426	G153A	88
		1		1-456	C214T <sup>i</sup> , A223G <sup>j</sup> , A426G	195
BIII/BIV	1	1	AF069560	1-449	A5G, T11Y, T57C <sup>k</sup> , T131Y, T134Y, A176R, A395G	141
		1		6-479	T11C, T57C <sup>k</sup> , A70R <sup>l</sup> , A176R, C237Y <sup>m</sup> , T299Y, C323Y, A395G	122

<sup>a</sup> Si T, pN8Y; <sup>b</sup> Secuencia de calidad insuficiente para determinar polimorfismo de nucleótido único; <sup>c</sup> pH12Y; <sup>d</sup> pP15S; <sup>e</sup> Si T, pH12Y; <sup>f</sup> Si T, pH72Y; <sup>g</sup> del: Delección de nucleótido (codón stop); <sup>h</sup> pN47K; <sup>i</sup> pH72Y; <sup>j</sup> pI75V; <sup>k</sup> pY19H; <sup>l</sup> Si G, pE23G; <sup>m</sup> Si T, pH79Y.

#### 4.5.2. Diversidad genética en *Cryptosporidium* spp.

La presencia de *Cryptosporidium* spp. fue confirmada mediante *ssu* rARN-PCR en el 1% (13/1.093) de las muestras investigadas. De ellas, 11 provenían de niños asintomáticos y 2 de niños sintomáticos. El análisis de las 13 secuencias generadas en este marcador reveló la presencia de 4 especies de *Cryptosporidium* circulando en la población escolar objeto de estudio: *C. hominis* (31%; 4/13), *C. parvum* (31%; 4/13), *C. felis* (31%, 4/13) y *C. viatorum* (7%, 1/13) (Tabla 30). Cabe destacar que *C. felis* es una especie de *Cryptosporidium* específicamente adaptada a infectar félidos en general y gatos en particular, mientras que *C. viatorum* infecta prioritariamente (pero no exclusivamente) a humanos. De las 4 secuencias identificadas como *C. hominis*, 2 de ellas eran idénticas a la secuencia de referencia AF108865. Las 2 secuencias restantes diferían de esta última en 1–2 SNPs incluyendo una delección y 2 posiciones ambiguas asociadas a dobles picos a nivel de cromatograma (Tabla 30). Ninguna de estas muestras pudo ser amplificada mediante *gp60*-PCR, por lo que su subgenotipo es desconocido.

**Tabla 30.** Frecuencia, diversidad genética y principales características de las secuencias de *Cryptosporidium* spp. generadas a partir del marcador *ssu* rARN en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique).

Especie	Muestras (n)	Secuencia de referencia	Distancia	Polimorfismo de nucleótido único	Código muestra
<i>C. hominis</i>	2	AF108865	542–998	Ninguno	83
	1		537–997	697Del_T	23
	1		539–989	A808R, G905R	77
<i>C. parvum</i>	1	AF112571	573–997	A646G, T649G, 686_689delTAAT <sup>a</sup> , A691T, C795Y, A892R	44
	1		630–997	A646G, T649G, 686_689delTAAT <sup>a</sup> , A691T, C795Y, T837W, A892R	20 <sup>b</sup>
	1		592–990	A646G, T649G, 686_690delTAATT <sup>a</sup> , A691T, A892G	33
	1		655–985	Desconocido <sup>c</sup>	48
<i>C. felis</i>	3	AF108862	631–980	662insT <sup>d</sup> , T671A, 701delT <sup>a</sup>	70
	1		648–987	662insT, T671A, 701delT <sup>a</sup> , 826insT <sup>d</sup>	178
<i>C. viatorum</i>	1	KX174309	290–762	Ninguno	66

<sup>a</sup> del: Delección de nucleótido(s); <sup>b</sup> Niño sintomático; <sup>c</sup> Secuencia de calidad insuficiente para determinar polimorfismo de nucleótido único; <sup>d</sup> ins: Inserción de nucleótido.

De las 4 secuencias identificadas como *C. parvum*, 3 correspondían a variantes del “genotipo bovino” del parásito que diferían entre ellas en un único SNP o en la presencia/ausencia de dobles picos en posiciones específicas de la secuencia. La cuarta secuencia mostraba una identidad del 99% con la secuencia de referencia AF112571, pero su calidad era insuficiente para determinar con exactitud la presencia de SNPs. Ninguna de estas muestras pudo ser amplificada mediante *gp60*-PCR, por lo que su subgenotipo es desconocido (Tabla 30). Ninguno de los SNPs detectados en las secuencias de *C. hominis* o *C. parvum* analizadas presentaban mutaciones asociadas a transversión de nucleótidos.

De las 4 secuencias identificadas como *C. felis*, 3 de ellas eran idénticas entre sí, pero diferían de la secuencia de referencia AF108862 en una inserción (T) en posición 662, una transición T/A en posición 671 y una deleción (T) en posición 701. La cuarta secuencia añadía a los anteriores cambios una inserción (T) en posición 826.

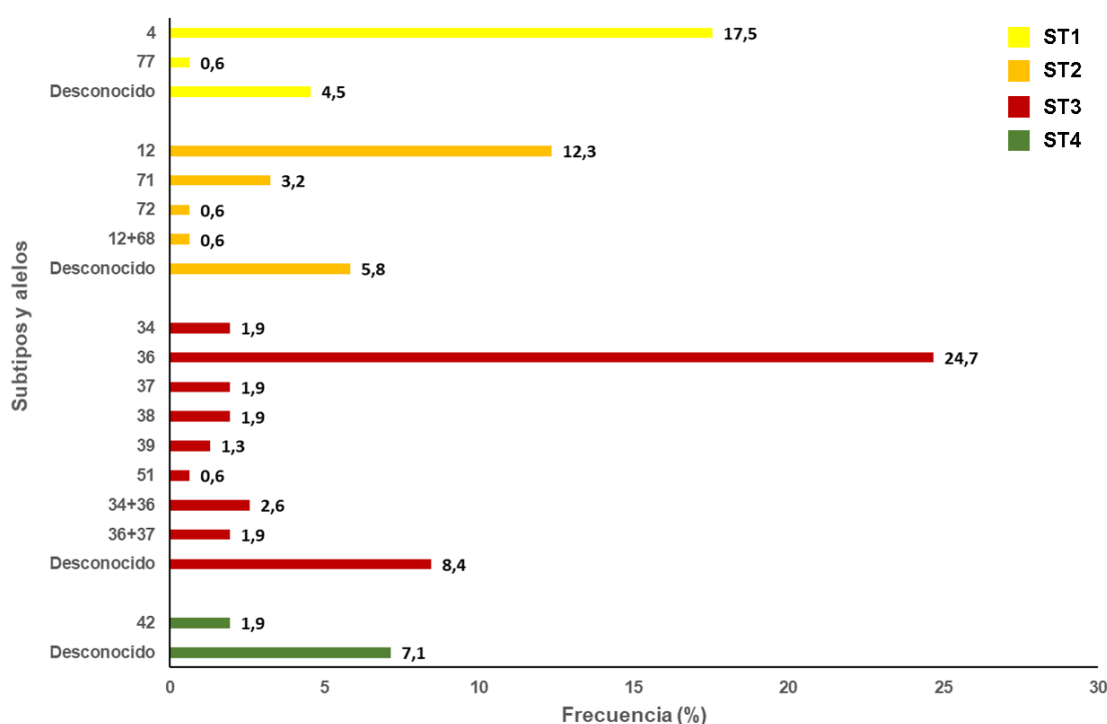
La única secuencia identificada como *C. viatorum* presentaba una identidad del 100% con la secuencia de referencia KX174309. Esta muestra pudo ser amplificada por *gp60*-PCR y el análisis de la secuencia generada a partir de este marcador reveló la presencia del subgenotipo XVaA3a del parásito (Tabla 30). Ésta es la primera descripción de una infección humana por *C. viatorum* en Mozambique.

### 4.5.3. Diversidad genética en *Blastocystis* sp.

La presencia de *Blastocystis* sp. fue determinada mediante *ssu* rARN-PCR en el 21% (227/1.093) de las muestras investigadas. De ellas, el 68% (154/227) fueron genotipadas con éxito. Las restantes 73 muestras generaron secuencias de baja calidad o ilegibles, típicamente asociadas a bandas tenues en el gel de agarosa tras la separación electroforética. Un porcentaje significativo (10%, 7/73) de ellas eran debidas a amplificaciones inespecíficas asociadas a microorganismos de origen bacteriano y fúngico detectadas por secuenciación. Por este motivo, la prevalencia de *Blastocystis* sp. (ver sección 4.2.4.) fue calculada, de forma conservadora, únicamente en base a secuencias confirmadas. Estos datos fueron también los usados en los análisis de asociación de riesgos (ver secciones 4.2.9. y 4.2.10.).

El análisis de las 154 secuencias confirmadas a partir del marcador *ssu* rARN permitió identificar la presencia de 4 STs de *Blastocystis* incluyendo ST1 (23%; 35/154), ST2 (23%; 35/154), ST3 (45%; 70/154) y ST4 (9%; 14/154) (Figura 27). No se hallaron infecciones mixtas implicando diferentes subtipos de este protista. Tampoco se detectó la presencia de STs considerados como especialmente adaptados a colonizar/infectar especies animales no humanas (ST10-ST17, ST21, ST23-ST26).

Respecto a la diversidad intra-subtipo, la mayor variabilidad genética fue hallada en ST3, en el que se identificaron 6 alelos presentes en forma única (alelos 34, 36, 37, 38, 39 y 51) o formando infecciones mixtas (34+36, 36+37) (Figura 27). En ST2 se encontraron 3 alelos presentes en forma única (alelos 12, 71 y 72). El alelo 12 fue también identificado en forma de coinfección con el alelo 68 (12+68). Por el contrario, sólo los alelos 4 y 77 fueron descritos en ST1, y el alelo 42 en ST4. Un total de 40 secuencias (7 en ST1, 9 en ST2, 13 en ST3 y 11 en ST4) no pudieron ser estudiadas a nivel alélico debido a la insuficiente calidad o longitud de éstas (Figura 27).

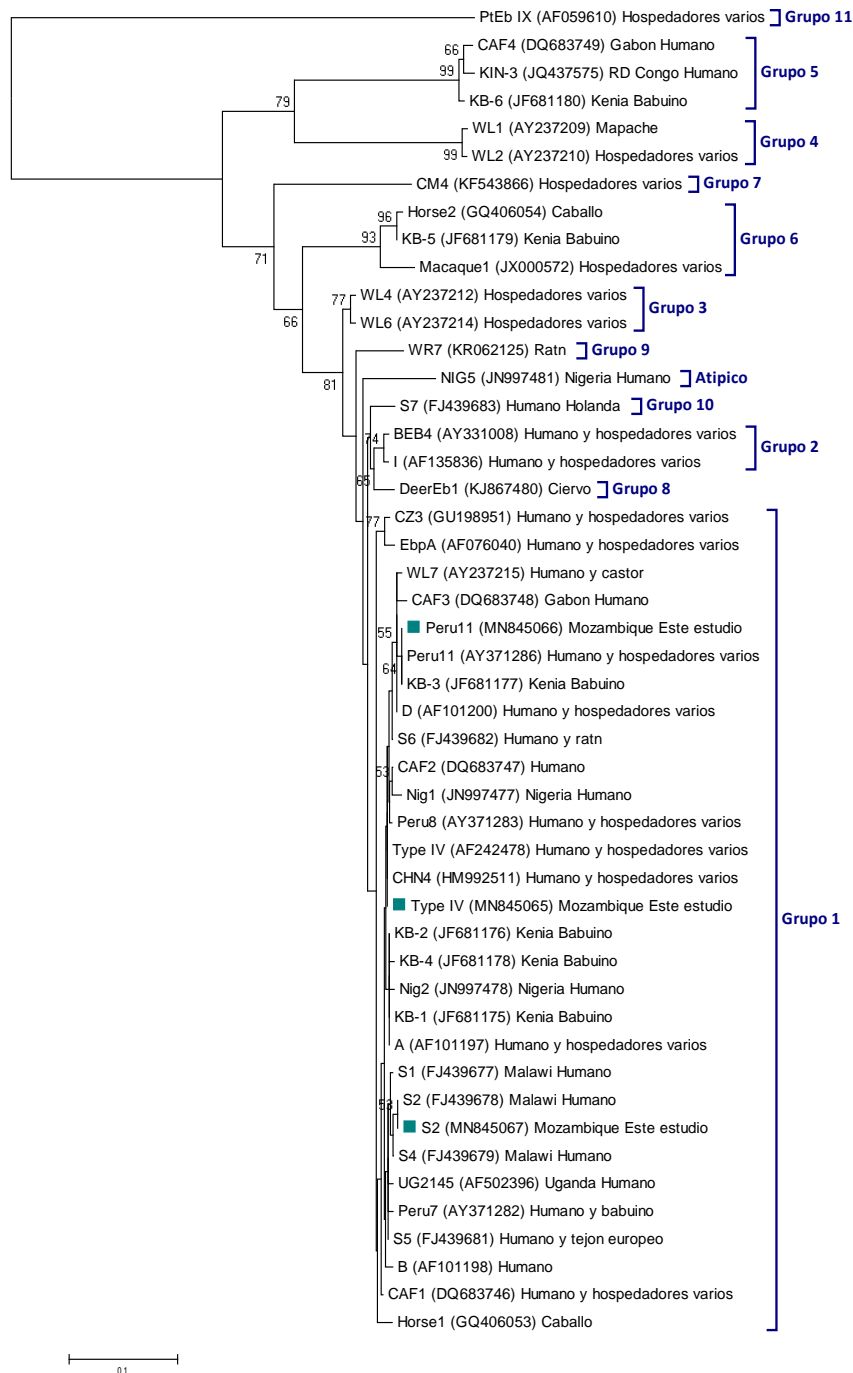


**Figura 27.** Frecuencia y diversidad genética de las secuencias de *Blastocystis* sp. generadas a partir del marcador *ssu* rARN en la población escolar de la provincia de Zambézia (Mozambique). Se indican los subtipos y alelos del microorganismo hallados.

#### 4.5.4. Diversidad genética en *Enterocytozoon bieneusi*

La presencia de *E. bieneusi* fue determinada mediante ITS-PCR en el 0,3% (3/1.093) de las muestras investigadas. El patógeno fue identificado exclusivamente en niños asintomáticos. El análisis de las 3 secuencias ITS generadas permitió la identificación de 3 genotipos diferentes de *E. bieneusi* (Peru11, S2 y Type IV), todos ellos previamente reportadas en infecciones humanas (p.e. Sulaiman *et al.*, 2003a; ten Hove *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2012). El genotipo S2 presentaba una delección en la posición 268 de la secuencia de referencia FJ439678. No se observaron infecciones mixtas implicando diferentes genotipos de *E. bieneusi*. El estudio

filogenético basado en el método de Neighbor-joining reveló que los 3 genotipos descritos se agrupaban dentro del Grupo 1 constituido por variantes genéticas de *E. bieneusi* con potencial zoonótico (Figura 28). En el análisis se incluyeron secuencias de origen humano y animal previamente documentadas en África con fines comparativos.



**Figura 28.** Árbol filogenético inferido mediante el método de Neighbor-Joining mostrando las relaciones evolutivas entre secuencias de *Enterocytozoon bieneusi* sin posiciones ambiguas generadas en este estudio a partir de marcador molecular ITS. Los valores de *bootstrap* > 50% se muestran en los nodos. Las secuencias generadas en este estudio se indican como cuadrados en verde.

Dos de los 3 niños positivos a *E. bieneusi* vivían en áreas rurales del distrito de Mocuba y asistían al mismo centro educativo, aunque estaban infectados por diferentes genotipos (Peru11 y S2) del patógeno. Ambos niños estaban coinfectados con *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp. El tercer niño procedía de un área urbana del distrito de Gurúe y estaba infectado por el genotipo Type IV del parásito. También estaba coinfectado por *G. duodenalis*.

#### 4.6. Comparación de datos moleculares en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique)

A modo de resumen comparativo, la [Tabla 31](#) muestra los datos más destacados referentes a la frecuencia y diversidad genética de los protistas entéricos objeto de estudio en la población pediátrica ( $n = 2.605$ ) investigada en el municipio de Leganés ( $n = 1.512$ ) en España y la provincia de Zambézia ( $n = 1.093$ ) en Mozambique.

**Tabla 31.** Frecuencia y diversidad genética de las especies de protistas entéricos en las poblaciones pediátricas investigadas en Leganés (España) y Zambézia (Mozambique).

Variable	Leganés (España)		Zambézia (Mozambique)	
	Asintomáticos <i>n</i> (%)	Asintomáticos <i>n</i> (%)	Asintomáticos <i>n</i> (%)	Sintomáticos <i>n</i> (%)
<i>Giardia duodenalis</i>	24 (100)	44 (100)	44 (100)	1 (100)
Sub-assemblage All	4 (17)	3 (7)	3 (7)	Desconocido
Sub-assemblage BIII	0 (0)	6 (14)	6 (14)	Desconocido
Sub-assemblage BIV	19 (79)	8 (18)	8 (18)	1 (100)
Sub-assemblage BIII/BIV	1 (4)	20 (46)	20 (46)	Desconocido
Assemblage B	0 (0)	5 <sup>c</sup> (11)	5 <sup>c</sup> (11)	Desconocido
Infecciones mixtas	0 (0)	2 (4)	2 (4)	Desconocido
Posiciones ambiguas <sup>a</sup>	Bajo-moderado	Muy alto	Muy alto	Desconocido
Transversiones <sup>b</sup>	Bajo	Moderado	Moderado	Desconocido
<i>Cryptosporidium</i> spp.	14 (100)	11 (100)	11 (100)	2 (100)
<i>C. hominis</i>	10 (71)	3 (27)	3 (27)	1 (50)
<i>C. parvum</i>	3 (21)	3 (27)	3 (27)	1 (50)
<i>C. felis</i>	0 (0)	4 (37)	4 (37)	0 (0)
<i>C. viatorum</i>	0 (0)	1 (9)	1 (9)	0 (0)
Especie no identificada	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Blastocystis</i> sp.	162 (100)	143 (100)	143 (100)	11 (100)
ST1	37 (23)	33 (23)	33 (23)	2 (18)
ST2	59 (36)	30 (21)	30 (21)	5 (46)
ST3	35 (22)	66 (46)	66 (46)	4 (36)
ST4	30 (19)	14 (10)	14 (10)	0 (0)
ST8	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	0 (0)	3 (100)	3 (100)	0 (0)
Peru11	0 (0)	1 (33)	1 (33)	0 (0)
S2	0 (0)	1 (33)	1 (33)	0 (0)
Type IV	0 (0)	1 (33)	1 (33)	0 (0)

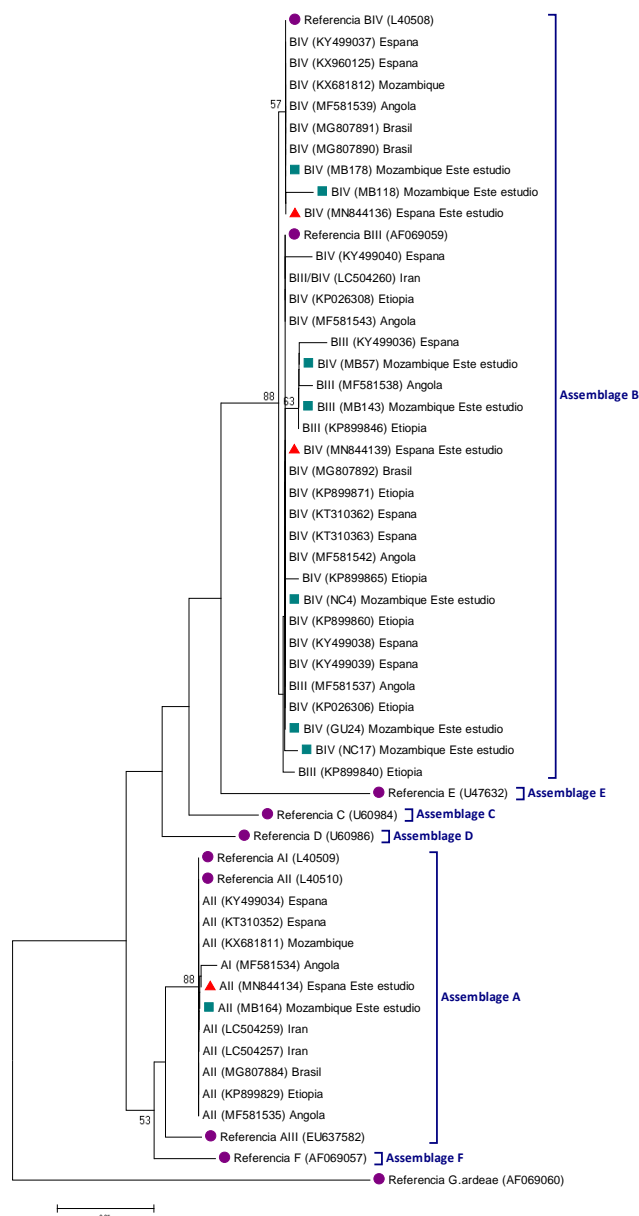
<sup>a</sup> Dobles picos a nivel de cromatograma; <sup>b</sup> Mutaciones A↔C, G↔T, A↔T o C↔G; <sup>c</sup> Sub-assemblage desconocido.

Respecto a *G. duodenalis*, el *assemblage* B era el genotipo más prevalentemente identificado en niños tanto en España (83%) como en Mozambique (89%). El *assemblage* A era minoritario, aunque más frecuente en niños españoles (17%) que mozambiqueños (7%). Las únicas infecciones mixtas A+B halladas fueron en niños asintomáticos de Mozambique. Las diferencias en cuanto a la variabilidad genética de las muestras de ambos países eran notables, particularmente en el *assemblage* B del parásito. En España, 6/16 y 7/9 muestras identificadas como BIV en *gdh* y *bg* eran idénticas a sus correspondientes secuencias de referencia (ver [Tabla 23](#)). Por el contrario, en Mozambique virtualmente todas las muestras pertenecientes a BIII (10 en *tpi*) y BIV (9 en *gdh*) eran diferentes entre sí (ver [Tabla 27](#) y [Tabla 29](#)). Particularmente revelador era el dato de que en España sólo el 5% (1/20) de las muestras identificadas como *assemblage* B generaban resultados ambiguos BIII/BIV, mientras que este porcentaje era del 48% (20/42) en Mozambique (ver [Tabla 22](#) y [Tabla 26](#)). Estos datos explican también la destacable mayor proporción de posiciones ambiguas (dobles picos) e infecciones mixtas detectada en muestras procedentes de Mozambique comparada con las observadas en muestras provenientes de España. Desafortunadamente, en Mozambique no se pudieron estudiar en profundidad las posibles asociaciones entre el genotipo del parásito y la presencia de manifestaciones clínicas debido al escaso número de muestras caracterizadas en niños sintomáticos (ver sección [4.5.1.](#)).

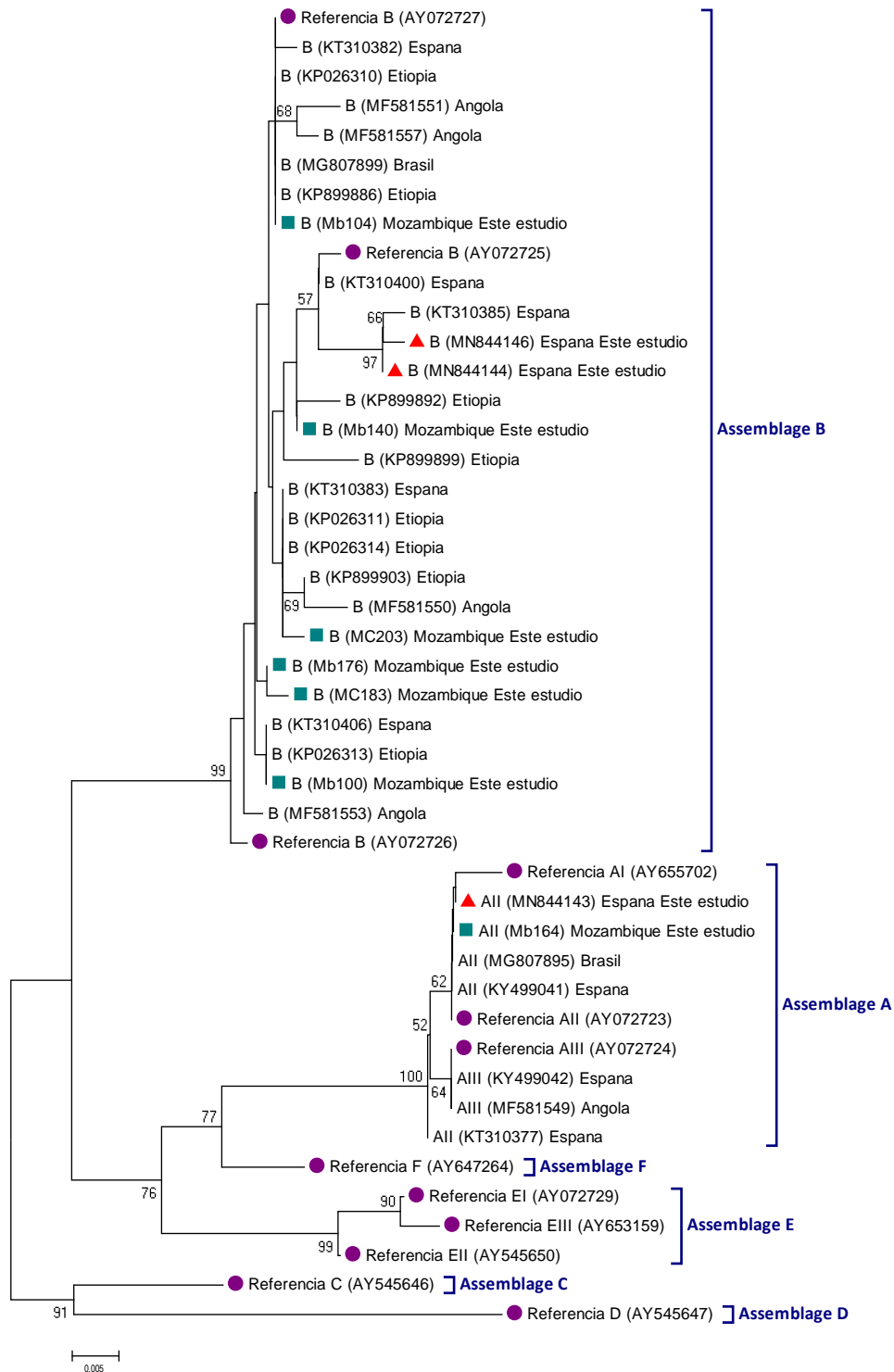
Los estudios filogenéticos basados en el método de Neighbor-Joining utilizando exclusivamente las secuencias sin posiciones ambiguas (dobles picos) generadas en España y Mozambique en los marcadores *gdh* ([Figura 29](#)), *bg* ([Figura 30](#)) y *tpi* ([Figura 31](#)) demostraron la correcta agrupación de todas ellas a nivel de *assemblage*. Sin embargo, la elevada heterogeneidad observada en las secuencias BIII y BIV (particularmente en las procedentes de Mozambique) no permitió la separación efectiva de ambos sub-*assemblages* en grupos filogenéticos claramente diferenciados ([Figura 29](#) y [Figura 31](#)). Este hecho apoyaría la hipótesis ya planteada en las secciones [4.4.1.](#) y [4.5.1.](#) de que muchas de estas secuencias corresponderían en realidad a infecciones mixtas BIII+BIV.

Respecto a *Cryptosporidium* spp., solo dos especies de este parásito fueron detectadas en la población pediátrica analizada en España, siendo *C. hominis* mucho más prevalente que *C. parvum* (71% vs. 21%, respectivamente). En Mozambique, 4 especies del parásito fueron identificadas: *C. hominis*, *C. parvum* y *C. felis* fueron encontradas en idénticas proporciones (31% cada una de ellas) en la población global estudiada, mientras que *C. viatorum* fue hallado de forma minoritaria (7%). *Cryptosporidium felis* y *C. viatorum* fueron descritos exclusivamente en muestras de niños asintomáticos. En niños sintomáticos *C. hominis* y *C. parvum* fueron

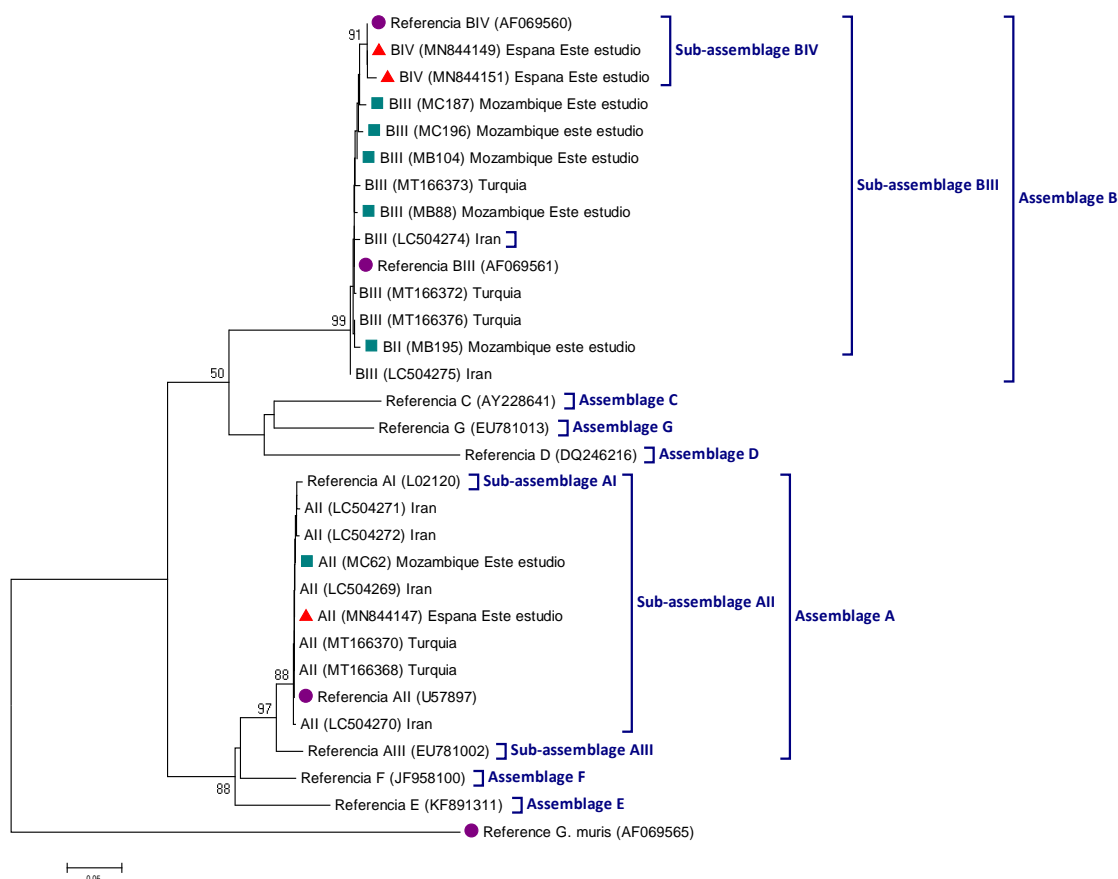
detectados en idénticas proporciones (50%). Dentro de *C. parvum*, el 33% de las infecciones halladas en niños españoles correspondía al “genotipo bovino” del parásito (ver Tabla 24). Esta proporción era del 100% en Mozambique (ver Tabla 30). El hallazgo de infecciones por *C. felis* y *C. parvum* “genotipo bovino” en una elevada proporción de niños mozambiqueños sugiere que muchos de estos casos pueden tener un origen zoonótico.



**Figura 29.** Árbol filogenético inferido mediante el método de Neighbor-Joining mostrando las relaciones evolutivas entre secuencias de *Giardia duodenalis* generadas en este estudio a partir de un fragmento de 412 pb (correspondiente a las posiciones 79–490 de L40508) del marcador molecular *gdh*. Los valores de *bootstrap* > 50% se muestran en los nodos. Las secuencias generadas en este estudio se indican como triángulos en rojo (España) o cuadrados en verde (Mozambique). Los círculos púrpura indican secuencias de referencia. A efectos comparativos se incluyen secuencias de origen humano generadas en el LRIP del CNM. *Giardia ardeae* fue usada como grupo externo.

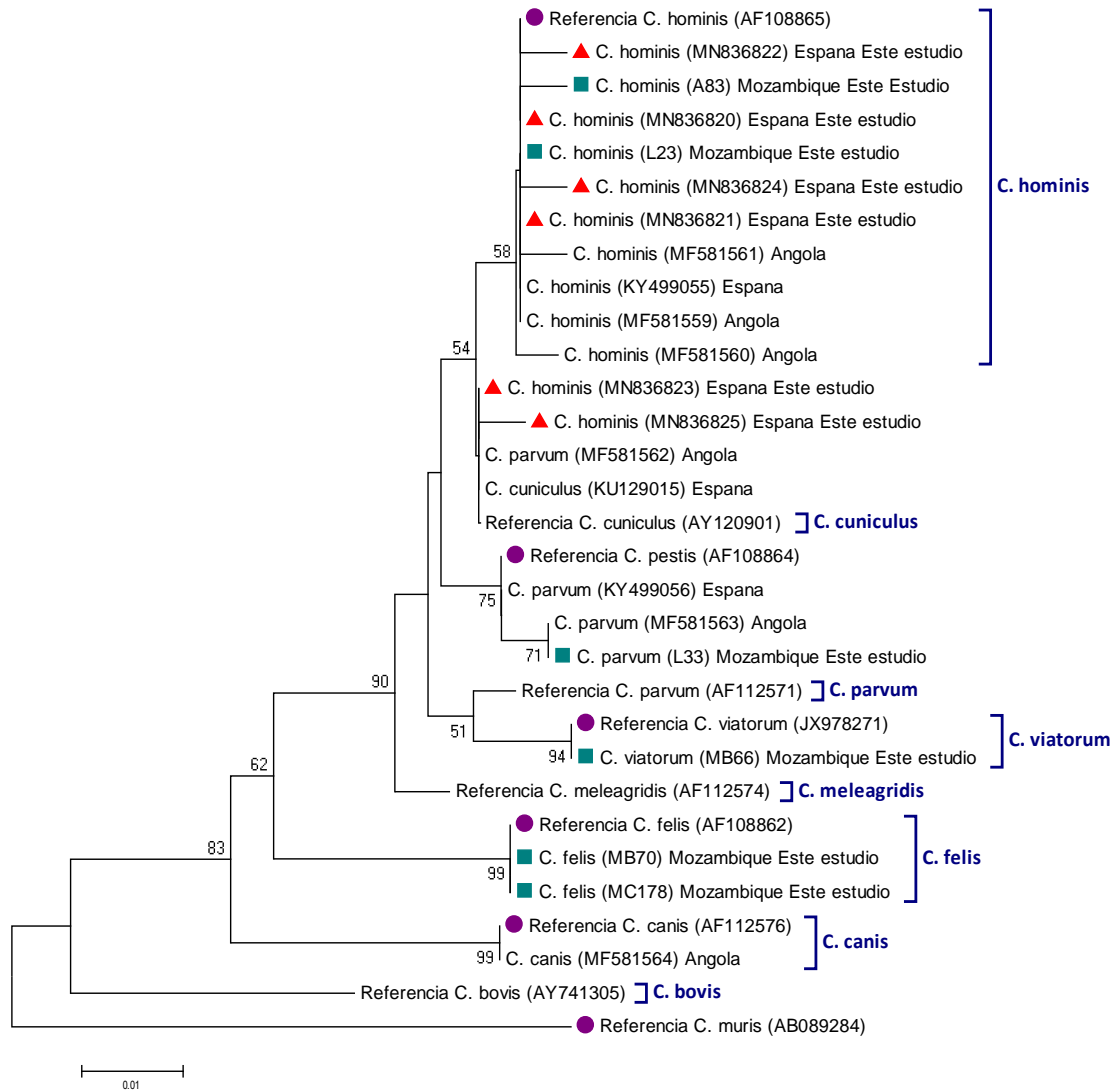


**Figura 30.** Árbol filogenético inferido mediante el método de Neighbor-Joining mostrando las relaciones evolutivas entre secuencias de *Giardia duodenalis* generadas en este estudio a partir de un fragmento de 502 pb (correspondiente a las posiciones 101–602 de AY072727) del marcador molecular *bg*. Los valores de *bootstrap* > 50% se muestran en los nodos. Las secuencias generadas en este estudio se indican como triángulos en rojo (España) o cuadrados en verde (Mozambique). Los círculos púrpura indican secuencias de referencia. A efectos comparativos se incluyen secuencias de origen humano generadas en el LRIP del CNM. Al ser *bg* específica de *G. duodenalis*, no se incluyó grupo externo.



**Figura 31.** Árbol filogenético inferido mediante el método de Neighbor-Joining mostrando las relaciones evolutivas entre secuencias de *Giardia duodenalis* generadas en este estudio a partir de un fragmento de 479 pb (correspondiente a las posiciones 1–479 de AF069560) del marcador molecular *tpi*. Los valores de *bootstrap* > 50% se muestran en los nodos. Las secuencias generadas en este estudio se indican como triángulos en rojo (España) o cuadrados en verde (Mozambique). Los círculos púrpura indican secuencias de referencia. A efectos comparativos se incluyen secuencias de origen humano generadas en el LRIP del CNM. *Giardia muris* fue usada como grupo externo.

Esta posibilidad estaría apoyada por la demostración previa de que el contacto habitual con animales de producción (patos) y compañía (perros y gatos) estaba asociado con una mayor probabilidad de infecciones por *G. duodenalis*, *E. dispar* y/o *Blastocystis* sp. (ver [Tabla 20](#)). El hecho de que este factor no tenga significancia estadística para *Cryptosporidium* spp. puede ser debido, al menos parcialmente, al limitado número de muestras positivas a este patógeno detectadas en Mozambique. Finalmente, el estudio filogenético basado en el método de Neighbor-Joining utilizando las secuencias generadas en España y Mozambique en el marcador *ssu rARN* se muestra en la [Figura 32](#). Todas las secuencias obtenidas se agrupaban correctamente con las correspondientes secuencias de referencia. El árbol filogenético generado incluía, a efectos comparativos, la especie propuesta *C. pestis* para el “genotipo bovino” de *C. parvum* (ver sección [4.4.2.](#)).



**Figura 32.** Árbol filogenético inferido mediante el método de Neighbor-Joining mostrando las relaciones evolutivas entre secuencias de *Cryptosporidium* spp. sin posiciones ambiguas generadas en este estudio a partir de un fragmento de 490 pb (correspondiente a las posiciones 538–1.027 de AF108865) del marcador molecular *ssu* rARN. Los valores de *bootstrap* > 50% se muestran en los nodos. Las secuencias generadas en este estudio se indican como triángulos en rojo (España) o cuadrados en verde (Mozambique). Los círculos púrpura indican secuencias de referencia. A efectos comparativos se incluyen secuencias de origen humano generadas en el LRIP del CNM. *Cryptosporidium muris* fue usado como grupo externo.

Respecto a *Blastocystis* sp., la diversidad de subtipos hallada en los niños analizados en España y Mozambique era casi idéntica, con ST1–4 presentes en ambas poblaciones. ST8 fue detectado en un único caso en España. Sí existían diferencias, sin embargo, en la frecuencia de aparición de los principales subtipos y alelos de este microorganismo. En España ST2 (36%) era el subtipo más prevalente, mientras que en Mozambique lo era ST3 (45%). En ambos países

ST1 estaba presente en idénticas proporciones (23%), mientras que ST4 era ligeramente más frecuente en niños españoles (19%) que mozambiqueños (14%). Respecto a las frecuencias alélicas, en ambos países el alelo 4 era el más prevalente en ST1 (22% vs. 18%), el alelo 12 en ST2 (17% vs. 12%) y el alelo 42 en ST4 (19% vs. 2%). En ST3 el alelo más frecuente era el 34 (15%) en España, mientras que en Mozambique lo era el 36 (25%) (ver [Figura 26](#) y [Figura 27](#)).





## 5. DISCUSIÓN



## 5. Discusión

Este estudio epidemiológico basado en pruebas moleculares compara la prevalencia, diversidad genética y riesgos asociados de las principales especies de protistas entéricos causantes de diarrea (*G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. y *E. bienersi*) en poblaciones pediátricas en edad escolar en un área de baja endemicidad (municipio de Leganés) en un país de renta media-alta (España) y un área de alta endemicidad (provincia de Zambézia) en un país de renta baja (Mozambique). La utilización, en ambos casos, de diseños muestrales, encuestas epidemiológicas, herramientas estadísticas y técnicas de diagnóstico y genotipado comunes o muy similares ha permitido la comparación directa de los resultados obtenidos con un alto grado de robustez y fiabilidad.

Históricamente, y por razones obvias, el estudio de las especies de protistas antes mencionadas ha sido prioritariamente abordado desde la perspectiva del paciente clínico atendido en un centro médico de un país industrializado. Esta visión obedece al hecho incontestable de que una gran parte de la investigación epidemiológica (prevalencia en humanos y animales, presencia en muestras ambientales, reservorios, transmisión, estacionalidad, factores predisponentes o protectores), clínica (síntomas asociados, dosis infectivas, tratamiento, fallo terapéutico, resistencias) y molecular (genómica, proteómica y metabolómica) y de innovación tecnológica (p.e. nuevos métodos diagnósticos) realizada en este área provengan de países desarrollados caracterizados por altos estándares de salubridad e higiene, y por disponer de los medios y recursos necesarios para acometer estas tareas. Conviene recordar que, precisamente por esta elevada inversión en infraestructura e investigación, la giardiosis, la criptosporidiosis, la amebiosis, la blastocistosis y la microsporidiosis por *E. bienersi* son normalmente enfermedades de baja prevalencia e intensidad asociadas a condiciones debilitantes y raramente fatales, y por lo tanto percibidas como no prioritarias (Fletcher *et al.*, 2012). Estas enfermedades, particularmente la giardiosis y la criptosporidiosis, adquieren notoriedad pública y sanitaria cuando aparecen en forma de brotes de enfermedad gastrointestinal de origen hídrico (Efstratiou *et al.*, 2017) o alimentario (Ryan *et al.*, 2018, 2019), o en enfermos inmunocomprometidos (Shimelis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018c; Shad *et al.*, 2019). Por el contrario, la información disponible sobre la presencia y diversidad molecular de estos patógenos en población aparentemente sana en general, y pediátrica en particular, es comparativamente mucho menor. Esta descripción genérica es

válida para encuadrar la situación epidemiológica actual de estos patógenos en España ([Köster y Carmena, 2020](#)).

El escenario es radicalmente distinto cuando se considera desde el punto de vista de los países de alta endemicidad, normalmente de renta baja, que acumulan la mayor carga de enfermedad global atribuida a estos patógenos en términos de morbilidad y mortalidad. En estos países, la diarrea ha sido reconocida como causa significativa de muerte en niños desde la década de 1970 ([Snyder y Merson, 1982](#)). Los 6 patógenos más relevantes causantes de diarrea incluyen agentes de origen vírico (adenovirus, rotavirus), bacteriano (*Campylobacter*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*) y parasitarios (*Cryptosporidium*). Ante la magnitud del problema, agencias internacionales incluyendo la OMS, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) han desarrollado e implementando una serie de medidas e intervenciones, de forma individual o conjunta, dirigidas a reducir de forma significativa la gravedad de la diarrea y las muertes a ella asociadas en niños. La última de éstas, iniciada en 2013, fue el Plan de Acción Global para la Prevención y el Control de la Neumonía y la Diarrea ([Bhutta et al., 2013](#); [Chopra et al., 2013](#); [Organización de las Naciones Unidas, 2013](#)). Como consecuencia de estas acciones, las tasas de mortalidad asociadas a diarrea en niños africanos menores de 5 años y la de incidencia de diarrea grave se redujeron en un 54% y un 18%, respectivamente, en el periodo 2000–2015 ([Reiner et al., 2018](#)).

A pesar del innegable progreso alcanzado, queda todavía mucho camino por delante para completar el reto. A este respecto, los datos proporcionados por el *Global Burden of Disease Study* (GBD) son elocuentes. Solo en 2016, la diarrea fue la octava causa de muerte en individuos de todas las edades (estimación: 1.656.000 muertes) y la quinta en niños menores de 5 años (estimación: 446.000 muertes) en todo el mundo ([Troeger et al., 2018](#)). El 90% de estas muertes se concentraban en países del sudeste asiático y África subsahariana ([GBD 2016 Causes of Death Collaborators, 2017](#)). Estos países se caracterizan por la carencia o insuficiente acceso a servicios médicos y asistenciales, agua potable e infraestructuras de saneamiento (sobre todo en poblaciones marginales), condiciones que perpetúan la transmisión de las infecciones transmitidas por la ruta fecal-oral ([GBD 2015 Diarrhoeal Diseases Collaborators](#)). Esta descripción genérica es válida para encuadrar la situación epidemiológica actual de los patógenos causantes de diarrea, incluidos los de origen parasitario, en Mozambique.

La percepción de la contribución de los protistas entéricos a la carga global de enfermedad diarreica ha ido evolucionando a lo largo de los años. Si bien inicialmente la

amebiosis por *E. histolytica* era considerada como la enfermedad infecciosa causante de diarrea de origen parasitario más importante (Walsh, 1986), los resultados de estudios epidemiológicos masivos más recientes como GEMS y MAL-ED han revelado que el papel de *Cryptosporidium* spp. es mucho más relevante de lo inicialmente estimado. La criptosporidiosis afecta a más de 7 millones de niños, es la segunda causa de muerte por diarrea (tras la infección por rotavirus) en niños menores de 5 años y causa 200.000 muertes en niños menores de 2 años en países de África subsahariana y el sudeste asiático (Kotloff *et al.*, 2013; Korpe *et al.*, 2018). Todavía más revelador es el dato de que, en este grupo de edad, la carga de enfermedad asociada a la criptosporidiosis ha sido estimada en 48 millones AVAD, una figura comparable a la causada por la tuberculosis (49 millones) y más de la mitad de la causada por la malaria (83 millones) o la infección por VIH/SIDA (82 millones) (Murray *et al.*, 2012). Según los datos generados en el modelo matemático *Global Waterborne Pathogen* para *Cryptosporidium* (GloWPa-Crypto), el consumo de agua contaminada no tratada sería una de las principales fuentes de infección por este patógeno, causando  $4.3 \times 10^7$  casos y  $1.6 \times 10^6$  AVAD en países de África subsahariana (Limaheluw *et al.*, 2019).

Al contrario que en el caso de *Cryptosporidium* spp., la infección por *G. duodenalis* no está positivamente asociada a diarrea aguda en niños en áreas endémicas de países de renta baja (Platts-Mills *et al.*, 2015; Bartelt y Platts-Mills, 2016), o incluso tiene un papel protector frente a ella (Muhsen y Levine, 2012; Muhsen *et al.*, 2014). De hecho, estudios epidemiológicos de casos y controles realizados en Costa de Marfil (Becker *et al.*, 2015), la República Centroafricana (Breurec *et al.*, 2016), Tanzania (Tellevik *et al.*, 2015), así como en el proyecto GEMS (Kotloff *et al.*, 2013), han demostrado que *G. duodenalis* era significativamente más prevalente en controles que en casos. Por estas razones, *G. duodenalis* está sistemáticamente ausente de las estimaciones de carga global asociada a diarrea (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). Esto no quiere decir, ni mucho menos, que la infección por *G. duodenalis* sea inocua en áreas endémicas. Sólo a modo de ejemplo, la presencia de este parásito ha sido asociada con desnutrición en niños en Ruanda (Ignatius *et al.*, 2012), retraso en el crecimiento en niños en India y Bangladesh (Ajjampur *et al.*, 2011; Donowitz *et al.*, 2016) y deficiencia cognitiva en niños en Perú (Berkman *et al.*, 2002). Estos efectos no son exclusivos de poblaciones pediátricas en regiones desfavorecidas, también han sido descritos (aunque en menor medida) en niños en países industrializados incluido España (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). Lo interesante de estos casos es que las patologías asociadas a los cambios en la arquitectura y la permeabilidad de la mucosa intestinal inducidos por la infección por *G. duodenalis* no

parecen estar ligadas a procesos de diarrea e inflamación (Bartelt y Platts-Mills, 2016), pero si a procesos de malabsorción de nutrientes y vitaminas y complicaciones extraintestinales como alergia y artritis (Thibault *et al.*, 2017). El efecto negativo de *G. duodenalis* en el desarrollo psicomotor y cognitivo de los niños afectados antes mencionado también ha sido observado en el caso de infecciones por *Cryptosporidium* spp. (p.e. Guerrant *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2012). Así, tanto la giardiosis como la criptosporidiosis deben ser además consideradas como enfermedades debilitantes con importantes consecuencias en el desarrollo social y económico de las regiones donde ambas son endémicas. Por este motivo, la giardiosis y la criptosporidiosis fueron incluidas en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas promovida por la OMS en 2004 (Savioli *et al.*, 2006).

*Blastocystis* sp. es una especie de patogenicidad incierta que ha atraído el interés de la comunidad científica en los últimos años por su posible relación con SII (Rostami *et al.*, 2017; Cifre *et al.*, 2018; Shafiei *et al.*, 2020) y diversas afecciones extraintestinales incluyendo urticaria (Bahrami *et al.*, 2019). Además, un estudio reciente ha indicado que los individuos portadores de este microorganismo presentaban índices de masa corporal inferiores a los no portadores, sugiriendo que *Blastocystis* sp. puede interferir en la ingesta de nutrientes y el metabolismo energético del hospedador (Mirjalali *et al.*, 2020). Otros estudios aportan sin embargo una visión radicalmente opuesta, considerando a *Blastocystis* sp. como un comensal que forma parte habitual de la microbiota intestinal durante periodos prolongados de tiempo de hasta 10 años (Scanlan y Marchesi, 2008; Scanlan *et al.*, 2014). La colonización por *Blastocystis* sp. también ha sido asociada a un efecto protector contra la colitis ulcerosa (Petersen *et al.*, 2013; Rossen *et al.*, 2015) y, más recientemente, con un incremento en la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal del hospedador (Kodio *et al.*, 2019). Es interesante destacar que exactamente el efecto contrario (disminución de la diversidad de la microbiota intestinal) ha sido descrito en chimpancés de vida libre en Senegal (Renelies-Hamilton *et al.*, 2019). *Blastocystis* sp. ya había sido descrito como un hallazgo común en individuos asintomáticos en países de renta media y alta (Scanlan y Stensvold, 2013), pero estudios recientes han demostrado que su prevalencia es aún mucho mayor en países de baja renta incluyendo los de África subsahariana (El Safadi *et al.*, 2014; D'Alfonso *et al.*, 2017).

Respecto a las infecciones por microsporidios incluyendo *E. bienewsi* y *Encephalitozoon* spp. la mayor parte de la información epidemiológica disponible actualmente provienen de pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de diversas infecciones o enfermedades. Así, una revisión sistemática y metaanálisis reciente de 131

trabajos publicados globalmente ha señalado la elevada prevalencia de estos patógenos oportunistas en pacientes VIH+ en países de renta baja, principalmente en África subsahariana (Wang *et al.*, 2018b). En estas regiones desfavorecidas, los estudios en población general asintomática son mucho menos frecuentes, e incluso inexistentes.

### Prevalencia

El estudio epidemiológico llevado a cabo en niños asintomáticos en el municipio de Leganés (CAM) es el más importante de su clase realizado en España hasta la fecha, aunando al elevado número de muestras analizadas, la alta sensibilidad diagnóstica de las técnicas moleculares usadas y el completo análisis de asociación de riesgos ejecutado paralelamente. La principal contribución de esta parte del trabajo es la demostración de que la prevalencia de algunos de los protistas entéricos investigados era mucho más alta de lo inicialmente esperado en niños aparentemente sanos. Este hecho tiene potencialmente importantes implicaciones en salud pública, ya que los niños portadores asintomáticos pueden transmitir estas infecciones a grupos de personas particularmente sensibles a ellas (otros niños, ancianos, individuos inmunocomprometidos) de forma inadvertida y facilitar así su dispersión y propagación.

Los datos obtenidos indicaron que el 28% de los niños de 4–14 años participantes en el estudio en Leganés estaban infectados/colonizados por al menos una especie de protista entérico, siendo *G. duodenalis* la más prevalente (17%), seguida de *Blastocystis* sp. (14%) y *Cryptosporidium* spp. (1%). *Enterocytozoon bieneusi* no fue detectado en ningún niño. La presencia de coinfecciones fue confirmada en el 4% de los niños. Estas cifras están en el rango de las documentadas en estudios previos realizados en niños inmunocompetentes en diferentes regiones españolas, tanto rurales como urbanas, donde *G. duodenalis* fue detectado en un rango de prevalencia de 3–36% en la provincia de Álava (Paulos *et al.*, 2018), Ávila (Pedraza Dueñas *et al.*, 1994), Cuenca (Jarabo *et al.*, 1995), Madrid (Mateo *et al.*, 2014), Salamanca (García-Rodríguez *et al.*, 1990; Rodríguez-Hernández *et al.*, 1996) y Valencia (Belda Rustarazo *et al.*, 2008). Por otra parte, la infección por *Cryptosporidium* spp. ha sido identificada en frecuencias de 1–10% en las provincias de Álava y Salamanca (García-Rodríguez *et al.*, 1990; Rodríguez-Hernández *et al.*, 1996; Paulos *et al.*, 2018), mientras que *Blastocystis* sp. fue hallado en el 5–20% de los niños investigados en Álava (Paulos *et al.*, 2018), Salamanca (Martín-Sánchez *et al.*, 1992) y Valencia (Belda Rustarazo *et al.*, 2008). Las prevalencias encontradas en estos estudios no necesariamente reflejan la epidemiología actual de los patógenos considerados, ya que algunos de ellos fueron llevados a cabo hace

más de 30 años. Por otra parte, todos estos trabajos fueron basados en técnicas diagnósticas convencionales (principalmente examen microscópico) menos sensibles que las técnicas de PCR usadas en este estudio. Los resultados aquí presentados proporcionan por lo tanto datos actualizados y más precisos sobre la prevalencia real de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* en población pediátrica asintomática en la CAM.

Los datos anteriormente mencionados son comparativamente superiores a los documentados en estudios epidemiológicos moleculares similares realizados en otros países europeos. Es el caso por ejemplo de *G. duodenalis*, detectada en porcentajes de infección de 1–7% en niños en guarderías en Holanda (Enserink *et al.*, 2014; Pijnacker *et al.*, 2016) y Reino Unido (Davies *et al.*, 2009), en niños participantes en campamentos estivales en Portugal (Júlio *et al.*, 2012) y en niños inmigrantes asintomáticos en Italia (Manganelli *et al.*, 2012). En el caso de *Blastocystis* sp. las prevalencias halladas variaban de forma significativa en función del área geográfica y el tipo de población considerada. Mientras que en un estudio multicéntrico implicando 788 pacientes y 11 hospitales realizado en Francia el porcentaje de portadores fue del 18% (El Safadi *et al.*, 2016), este valor ascendía al 56% en adultos sanos ( $n = 105$ ) en Irlanda (Scanlan *et al.*, 2014). Por su parte, *Cryptosporidium* spp. ha sido hallado en el 1% de los niños menores de 40 meses en Reino Unido (Davies *et al.*, 2009), y en el 3% de los niños en guarderías en Holanda (Enserink *et al.*, 2014).

La mayoría de las infecciones por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. asociadas a manifestaciones clínicas en Europa han sido detectadas en niños menores de 3 años (Cacciò y Chalmers, 2016). Por el contrario, en este trabajo ambos patógenos han sido identificados en niños de todos los grupos etarios. Así, mientras que el total de los niños participantes tenían una mediana de 7 años, este valor era de 8 años en los niños infectados/colonizados por *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp., y de 9 años en los niños infectados por *Cryptosporidium* spp. Estos datos indican que las infecciones subclínicas por estos microorganismos no estaban restringidas a un grupo de edad concreto. Este resultado puede ser una consecuencia directa del grado de desarrollo del sistema inmunológico del niño, más maduro en los de mayor edad y por lo tanto capaz de bloquear el tránsito desde infección subclínica a enfermedad. En este sentido, investigaciones previas realizadas tras la aparición de brotes de enfermedad gastrointestinal (Hanevik *et al.*, 2011) o en condiciones de alta incidencia (Priest *et al.*, 2006) han demostrado que las infecciones por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. son capaces de estimular y desencadenar una respuesta inmune protectora por parte del hospedador asociada a una menor probabilidad de reinfección y a una reducción de la virulencia de los síntomas en infecciones secundarias. Otros factores potencialmente involucrados en la

resolución de la infección incluyen el genotipo del parásito (Babaei *et al.*, 2016) o la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal del hospedador (Laurent y Lacroix-Lamandé, 2017).

En España, el microsporidio *E. bienewisi* ha sido previamente descrito en individuos inmunocomprometidos incluyendo pacientes con VIH/SIDA (del Águila *et al.*, 1997), receptores de trasplante de órgano sólido (Galván *et al.*, 2011), personas de avanzada edad (Lores *et al.*, 2002) y, en menor medida, en población general inmunocompetente (Abreu-Acosta *et al.*, 2005). Por el contrario, *E. bienewisi* no ha sido hallado en la población escolar asintomática aquí investigada, sugiriendo que los niños de 4–14 años no tienen un papel relevante como reservorio de este patógeno en la CAM. En el único estudio basado en PCR realizado en Europa hasta el momento, *E. bienewisi* ha sido encontrado en el 6% (23/382) de los individuos aparentemente sanos investigados en la República Checa (Sak *et al.*, 2011). Sólomente 4 de los 23 casos identificados afectaban a niños  $\leq 12$  años.

En el estudio epidemiológico llevado a cabo en Leganés participaron 12 centros educativos con marcadas diferencias respecto al número de niños escolarizados, distribución geográfica dentro del municipio, tasa de participación y tipo de gestión (pública, concertada, privada). Un aspecto destacable del trabajo era la elevada variabilidad observada de las prevalencias de protistas en función del colegio investigado. El caso más evidente era el de *G. duodenalis*, cuya prevalencia oscilaba entre 2% y 32%. Estos datos sugieren la existencia de microfocos de infecciones asintomáticas oportunísimamente transmitidas de forma local cuando las condiciones para ello eran las adecuadas. La frecuencia y relevancia epidemiológica de estos microfocos de infección ya ha sido objeto de estudio en núcleos familiares con niños en edad preescolar en Holanda (Heusinkveld *et al.*, 2016) y Reino Unido (Waldram *et al.*, 2017).

El estudio epidemiológico llevado a cabo en niños asintomáticos y sintomáticos en la provincia de Zambézia es el segundo más importante en cuanto a número de participantes ( $n = 1.093$ ) realizado en Mozambique tras la ejecución de la primera fase del proyecto GEMS ( $n = 1.784$ ) en la provincia de Maputo (Baker *et al.*, 2016). A nivel diagnóstico, la principal diferencia entre ambos trabajos radica en que GEMS basaba la detección de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica* en kits comerciales de ELISA de captura para la detección de antígenos parasitarios en heces (Panchalingam *et al.*, 2012), métodos con una sensibilidad diagnóstica inferior a la de las técnicas moleculares usadas en este estudio. Esta limitación fue evidenciada por el propio consorcio del proyecto GEMS cuando tras reanalizar por PCR 521 de las muestras recogidas se comprobó que las prevalencias observadas para estos 3 patógenos era mayor que las inicialmente estimadas mediante ELISA (Liu *et al.*, 2016).

La principal contribución de esta parte del trabajo es la demostración de que uno de cada dos niños en Zambézia estaba infectado/colonizado por al menos una especie de protista entérico, independientemente de la presencia/ausencia de manifestaciones clínicas. Estos resultados coinciden con los generados en estudios previos realizados tanto en áreas urbanas (Knee *et al.*, 2018) como rurales (Nhampossa *et al.*, 2015) de la provincia de Maputo en los que se constató que la mayoría de las infecciones por estos patógenos eran documentadas en niños aparentemente sanos de corta edad. De forma conjunta, estos datos describen un escenario epidemiológico altamente endémico donde los eventos de infección y reinfección deben ser extraordinariamente frecuentes.

Los datos obtenidos indicaron que el 54% de los niños de 3–14 años participantes en el estudio en Zambézia estaban infectados/colonizados por al menos una especie de protista entérico, siendo *G. duodenalis* la más prevalente (42%), seguida de *Blastocystis* sp. (14%), *E. dispar* (11%), *Cryptosporidium* spp. (1%) y *E. bienersi* (0,3%). *Entamoeba histolytica* no fue detectada en ningún niño, mientras que la presencia de coinfecciones fue confirmada en el 12% de los niños investigados. Cuando estos datos son contrastados con los descritos en estudios epidemiológicos previos realizados en Mozambique (y por extensión, en otros países africanos), uno de los aspectos más llamativos es la marcada diferencia en el rango de prevalencias reportadas en función de la técnica diagnóstica empleada. En el caso de *G. duodenalis*, y usando la microscopía como método de detección, las prevalencias halladas oscilaron entre 1–6% en población pediátrica y general, portadora y no portadora de VIH, en Maputo (Mandomando *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2014; Cerveja *et al.*, 2017). Valores superiores (10–15%) han sido descritos mediante ELISA en niños con diarrea en un estudio multiprovincial (Bauhofer *et al.*, 2020) y en Maputo (Acácio *et al.*, 2019), aunque otro estudio reportó en la misma población y con la misma técnica una prevalencia del 50% (Nhampossa *et al.*, 2015). Usando PCR como método diagnóstico, *G. duodenalis* ha sido identificada en pacientes con VIH y/o TB (8%) en el distrito de Chowke, provincia de Gaza (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en población general (37%) en Beira, la capital de la provincia de Sofala (Meurs *et al.*, 2017). Por lo tanto, la prevalencia para este parásito detectada en este trabajo (42%) es la mayor descrita por PCR en Mozambique hasta la fecha. Prevalencias de *G. duodenalis* superiores al 40% han sido también documentadas, mayoritariamente en población pediátrica con y sin diarrea, por microscopía en Burkina Faso (Karou *et al.*, 2011) y por PCR en Etiopía (de Lucio *et al.*, 2016a), Guinea-Bisáu (Ferreira *et al.*, 2012), Kenia (Easton *et al.*, 2016), Ruanda (Ignatius *et al.*, 2012), Santo Tomé y Príncipe (Lobo *et al.*, 2014), Tanzania (Moyo *et al.*, 2011) y Uganda (Johnston *et al.*, 2010).

El análisis de los datos de prevalencia de *Cryptosporidium* spp. también plantea cuestiones interesantes. Por ejemplo, este patógeno ha sido descrito mediante ELISA en poblaciones pediátricas con diarrea en tasas de infección del 19–38% en la provincia de Maputo (Nhampossa *et al.*, 2015; Acácio *et al.*, 2019) y del 12% a escala nacional (Bauhofer *et al.*, 2020). Sin embargo, la prevalencia hallada en Zambézia por PCR fue del 1% tanto en niños sintomáticos como asintomáticos. Usando esta misma técnica, *Cryptosporidium* spp. ha sido detectado en el 8% de pacientes con VIH y/o TB en Chowke, Gaza (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en adultos con diarrea en Maputo (Casmó *et al.*, 2018). En otros países africanos, *Cryptosporidium* spp. ha sido hallado mediante PCR en prevalencias superiores al 10% tanto en poblaciones pediátricas como generales en Etiopía (Adamu *et al.*, 2014), Kenia (Wanyiri *et al.*, 2014), República Centroafricana (Bouyou-Akotet *et al.*, 2016), Tanzania (Moyo *et al.*, 2011) y Uganda (Salyer *et al.*, 2012). Las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos mediante ELISA y PCR pueden reflejar variaciones epidemiológicas (esperables hasta cierto punto) entre diferentes áreas geográficas en Mozambique, pero también es plausible que una proporción de los casos detectados por ELISA correspondan en realidad a falsos positivos. En base a estas observaciones, la correcta validación de este tipo de ensayos en estudios epidemiológicos de campo es altamente deseable.

En este estudio no se detectó la presencia de *E. histolytica* en ninguno de los niños investigados en Zambézia, mientras que la especie no patógena (pero morfológicamente idéntica) *E. dispar* fue hallada en el 11% de ellos. En línea con lo anteriormente expuesto para *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., la revisión de la literatura disponible para *E. histolytica* tanto en Mozambique como en otros países africanos ofrece resultados discrepantes y en ocasiones incompatibles. En Mozambique, *E. histolytica* ha sido identificada mediante ELISA en población pediátrica con diarrea en una prevalencia del 13% en Maputo (Acácio *et al.*, 2019) y del 2% a nivel nacional (Bauhofer *et al.*, 2020). Un tercer trabajo reportó la presencia de *E. histolytica/dispar* (sin diferenciación de especies) mediante ELISA con una prevalencia del 12% también en Maputo (Nhampossa *et al.*, 2015). Sorprendentemente, ese patógeno ha sido supuestamente detectado en el 31% (25.999/83.331) de los niños investigados en 140 distritos de 10 provincias del país por microscopía (Augusto *et al.*, 2009), una técnica que no permite la diferenciación de *E. histolytica* de otras especies de amebas no patógenas. Este tipo de discrepancias son frecuentes en la literatura científica, particularmente en estudios preliminares realizados en el siglo XX (p.e. Oyerinde *et al.*, 1979). Por el contrario, *E. histolytica* no fue hallada en pacientes con VIH y/o TB en Chowke (provincia de Gaza) usando PCR como herramienta

diagnóstica (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017), que sí eran portadores sin embargo de *E. dispar* (5%). Estos resultados son similares a los descritos, también mediante PCR, tanto en este trabajo como en otros países africanos. Así, *E. histolytica* tampoco ha sido hallada en otros países africanos como Etiopía (Kebede *et al.*, 2004) y Nigeria (Efunshile *et al.*, 2015), donde la prevalencia de *E. dispar* era del 92% y 19%, respectivamente. Teniendo en cuenta que los quistes de *E. histolytica* y *E. dispar* son morfológicamente indiferenciables, los datos anteriormente expuestos sugieren que las prevalencias de *E. histolytica* determinadas en estudios previos basados exclusivamente en microscopía (y probablemente también en ELISA) estén sobreestimando las tasas de infección reales atribuibles a este patógeno (Efunshile *et al.*, 2015). Es muy probable por lo tanto que la epidemiología de *E. histolytica* deba ser reevaluada mediante nuevos estudios en muchas regiones de África subsahariana en los próximos años.

Los primeros estudios sobre *Blastocystis* sp. en África datan de 2010, por lo que la información disponible es muy reducida. Así, en Mozambique, *Blastocystis* sp. ha sido identificado mediante microscopía en pacientes con VIH y/o TB (13%) en Chowke, Gaza (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017) y en población pediátrica escolar (21%) en la provincia de Nampula (Guidetti *et al.*, 2011). Una prevalencia muy similar (21%) ha sido hallada mediante PCR en población general asintomática en la provincia de Sofala (Meurs *et al.*, 2017). De forma global, los datos disponibles en Mozambique son inferiores a los generalmente documentados en otros países africanos, donde la colonización por este patógenos ha sido descrita en diferentes tipos de población en porcentajes superiores al 50% en Costa de Marfil (D'Alfonso *et al.*, 2017), Egipto (Fouad *et al.*, 2011), Liberia (Alfellani *et al.*, 2013a), Madagascar (Greigert *et al.*, 2018) y Tanzania (Forsell *et al.*, 2016), y por encima del 90% en Egipto (Souppart *et al.*, 2010) y Senegal (El Safadi *et al.*, 2014). Todos estos estudios fueron basados en técnicas de PCR y los datos obtenidos demuestran que la colonización por *Blastocystis* sp. es extraordinariamente común en la población humana del continente africano.

Los proyectos GEMS y MAL-ED han contribuido enormemente a esclarecer la epidemiología de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica* y su asociación con diarrea en niños de corta edad en países de África subsahariana incluido Mozambique (Kotloff *et al.*, 2013, 2019; Korpe *et al.*, 2018). Sin embargo, la situación de las infecciones por microsporidios en general y *E. bienersi* en particular (no incluidos en GEMS y MAL-ED) sigue siendo prácticamente desconocida en este continente. En el único estudio realizado hasta el momento en Mozambique, este patógeno fue detectado mediante PCR en el 9% (28/301) de

la población investigada en un estudio comunitario realizado en Beira, provincia de Sofala (Meurs *et al.*, 2017). Esta prevalencia es muy superior a la identificada en el presente trabajo (0,3%) en la provincia de Zambézia usando la misma técnica. Esta variabilidad puede reflejar patrones específicos en la distribución geográfica o vías de transmisión del parásito, pero también puede estar asociada, al menos parcialmente, a diferencias en el estatus socioeconómico de las poblaciones investigadas. Así, el estudio en Beira fue llevado a cabo en un área suburbial de alta incidencia, con inundaciones periódicas y sin infraestructuras de saneamiento, tras detectarse un aumento inusual en el número de personas con diarrea que requerían asistencia médica. En otros países africanos *E. bieneusi* ha sido documentado mediante PCR en prevalencias del 4–9% en niños aparentemente sanos en Nigeria (Ayinmode *et al.*, 2011), Santo Tomé y Príncipe (Lobo *et al.*, 2014), Sudáfrica (Samie *et al.*, 2007) y Uganda (Tumwine *et al.*, 2005). Prevalencias aún mayores (20–67%) han sido reportadas en población pediátrica y general inmunocompetente en Camerún (Nkinin *et al.*, 2007), Nigeria (Ikeh *et al.*, 2007) y Tanzania (Cegielski *et al.*, 1999) usando microscopía como técnica de detección. Tal y como se ha comentado anteriormente en el caso de *E. histolytica*, estos datos deben ser interpretados con extrema cautela, ya que las esporas de *E. bieneusi* y *Encephalitozoon* spp. son morfológicamente idénticas y se requieren técnicas moleculares para su diagnóstico diferencial. Otro aspecto relevante de este estudio es el hallazgo de *E. bieneusi* en niños aparentemente sanos, pero no en niños con manifestaciones intestinales. Sin embargo, el limitado número de muestras positivas a este patógeno ( $n = 3$ ) hace difícil valorar la significancia real de este dato.

La comparación de las prevalencias de protistas entéricos halladas en las poblaciones pediátricas analizadas en Leganés y Zambézia permiten extraer una serie de conclusiones valiosas desde el punto de vista tanto epidemiológico como de salud pública. En primer lugar, las infecciones por estos patógenos tendían a manifestarse, en condiciones ambientales favorables, como microfocos locales de naturaleza oportunista en Leganés, pero eran mucho más estables y extendidas en el caso de Zambézia. Estos datos concordarían con los escenarios epidemiológicos esperables en regiones de baja endemicidad (España) y alta endemicidad (Mozambique). Esta situación también explicaría las diferencias observadas en las tasas de parasitación/colonización por al menos una especie de protista (28% vs. 54%) y de infecciones mixtas (4% vs. 12%) observadas entre las poblaciones pediátricas investigadas en ambos países. En segundo lugar, es destacable la inesperada similitud en las prevalencias de algunas especies de protistas halladas en los niños de Leganés y Zambézia. Es el caso de *Cryptosporidium* spp. (1% vs. 1%), *Blastocystis* sp. (14% vs. 18%) y *E. bieneusi* (0% vs. 0,3%).

Este resultado es difícil de explicar dadas las diferencias de recursos higiénico-sanitarios y de infraestructuras de agua potable y saneamiento entre España y Mozambique. Por el contrario, la tasa de infección por *G. duodenalis* sí era claramente superior en Mozambique que en España (42% vs. 17%).

### Asociación de riesgos

Como parte integral de este trabajo se ha incluido un detallado análisis de asociación de riesgos a partir de las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas obtenidas en las encuestas epidemiológicas realizadas en las poblaciones pediátricas de Leganés y Zambézia. Esta medida de asociación trata de estimar la magnitud con la que dos fenómenos se relacionan, y es importante tener en cuenta que dicha asociación no implica necesariamente causalidad. Para ello se usaron, en primer lugar, técnicas de estadística descriptiva de regresión logística basadas en el análisis de una única característica del individuo ([Heinze y Schemper, 2002](#)), que podía presentarse en diversas modalidades, definidas y mutuamente excluyentes (análisis univariante). Aquellas variables que fueron significativas en las correspondientes regresiones logísticas simples fueron reanalizadas conjuntamente en una regresión logística múltiple (análisis multivariante).

Este estudio constituye el análisis de asociación de riesgos de protistas entéricos en población pediátrica asintomática más exhaustivo realizado en España hasta la fecha. La mayoría de los trabajos previos realizados en poblaciones similares no utilizaron encuestas epidemiológicas específicamente diseñadas para tal fin ([Pedraza Dueñas et al., 1994](#); [Jarabo et al., 1995](#); [Rodríguez-Hernández et al., 1996](#); [Belda Rustarazo et al., 2008](#)), y cuando lo hicieron no emplearon herramientas estadísticas avanzadas ([Mateo et al., 2014](#); [Paulos et al., 2017](#)). Además, el elevado número de niños participantes y los rigurosos criterios de selección impuestos aseguraron la obtención de resultados con una elevada robustez y fiabilidad.

Los análisis de riesgos univariantes y multivariantes revelaron asociaciones entre las infecciones primarias y secundarias de las especies de protistas investigadas. Por ejemplo, en el modelo multivariante ajustado final, las infecciones tanto por *G. duodenalis* como por *Cryptosporidium* spp. estaban positivamente asociadas con la presencia de *Blastocystis* sp., y viceversa. Sin embargo, no se observaron asociaciones entre *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. Estos resultados eran altamente esperados, ya que los 3 microorganismos son transmitidos por la misma vía (fecal-oral) y, por lo tanto, la identificación de uno de ellos incrementaba la probabilidad de hallar alguna de las 2 especies restantes. La ausencia de

asociación entre *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. puede ser explicada por el limitado número de niños positivos a este último patógeno. Sin embargo, estos datos abren la puerta a posibilidades de gran atractivo que deben ser convenientemente evaluadas en estudios posteriores. Por ejemplo, la colonización por *Blastocystis* sp. puede favorecer la presencia (y posible infección) de otros protistas en el tracto intestinal del hospedador. Así, en un estudio multicéntrico realizado en Francia la presencia de *Blastocystis* sp. era significativamente mayor en pacientes e individuos con historial reciente de viajes al extranjero infectados por protozoos y helmintos intestinales que en aquéllos no infectados (El Safadi *et al.*, 2016). Siguiendo la misma línea de razonamiento, las coinfecciones por *Blastocystis* sp. y *G. duodenalis* han sido identificadas también en el 4% de niños asintomáticos escolarizados en Líbano (Osman *et al.*, 2016) y en el 20% de niños indígenas aparentemente sanos en la región Amazónica de Colombia (Sánchez *et al.*, 2017).

En este trabajo, la probabilidad de detectar *Blastocystis* sp. era directamente proporcional a la edad de los niños portadores hasta los 10 años, a partir de la cual el riesgo decrecía. Esta asociación sugiere que *Blastocystis* sp. es capaz de esquivar (o modular) la respuesta inmunitaria del hospedador tras la colonización inicial. De demostrarse, este resultado confirmaría los obtenidos en estudios previos indicando que el microorganismo puede mantenerse de forma continua y prolongada (hasta 10 años) en un mismo individuo (Scanlan y Marchesi, 2008) y su naturaleza es, por la tanto, comensal en primera instancia. Datos apuntando en la misma dirección han sido también reportados en otros trabajos. Por ejemplo, *Blastocystis* sp. era significativamente más prevalente en niños aparentemente sanos mayores de 5 años que en niños menores de esa edad en la provincia de Álava, España (Paulos *et al.*, 2018). Del mismo modo, en el estudio multicéntrico francés anteriormente mencionado, *Blastocystis* sp. era significativamente más frecuente en individuos de 15 a 49 años que en individuos menores de 15 años (El Safadi *et al.*, 2016). El mismo patrón de distribución de *Blastocystis* sp. en función de la edad ha sido descrito en niños huérfanos y sus cuidadores en Tailandia (Pipatsatitpong *et al.*, 2012).

En este trabajo el factor “ser niña” estaba positivamente asociado a un mayor riesgo de infección por *Cryptosporidium* spp. Éste es un hallazgo inesperado para el que no existe una explicación biológica o de comportamiento social obvia. No es descartable que sea el efecto de un confundidor no detectado en los análisis estadísticos realizados. Sí existen, sin embargo, varios trabajos previos describiendo el efecto opuesto: *Cryptosporidium* spp. ha sido más prevalentemente hallado en niños menores de 5 años en Suecia tras un brote de criptosporidiosis de transmisión hídrica (Adler *et al.*, 2017), y en niños de corta edad

participando en estudios de casos (diarrea) y controles (no diarrea) en Brasil ([Agnew et al., 1998](#)) y Guinea Bisáu ([Mølbak et al., 1994](#)).

Finalmente, el modelo multivariante ajustado final demostró que el lavado de manos tenía un efecto protector contra la colonización por *Blastocystis* sp. Este resultado no es sorprendente ya que la falta de higiene personal es uno de los factores clave en la transmisión de parásitos intestinales, sobre todo en países donde el acceso a agua potable es restringido ([Choy et al., 2014](#)). Éste no es el caso de España, donde, en cumplimiento de la legislación vigente ([Real Decreto 902/2018](#)), existe una normativa estricta sobre la calidad del agua de consumo humano. Desafortunadamente, esta normativa aún no hace mención específica a las especies de protistas entéricos objeto de este estudio ([Comisión Europea, 1998](#)), a pesar de que la Oficina Regional para Europa de la OMS así lo recomienda para el caso de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* ([Organización Mundial de la Salud, 2017](#)).

Al contrario que en España, en Mozambique se han publicado desde 2015 hasta la actualidad 3 estudios epidemiológicos dirigidos a estimar los riesgos asociados a la morbilidad y mortalidad por patógenos entéricos de origen vírico, bacteriano y parasitario en niños menores de 5 años. Dos de ellos han sido realizados bajo el auspicio del proyecto GEMS (estructurado como un estudio de casos y controles) en el área rural del distrito de Manhica en la provincia de Maputo ([Nhampossa et al., 2015](#); [Acácio et al., 2019](#)). El tercero (estructurado como un estudio transversal) fue llevado a cabo por un grupo de investigación independiente en niños de 17 barriadas desatendidas de la capital, Maputo ([Knee et al., 2018](#)). Todos ellos coincidieron en identificar la falta de acceso a agua potable, las condiciones de insalubridad y la carencia de infraestructuras de saneamiento como los principales factores asociados a la transmisión de estos agentes infecciosos. El presente trabajo amplía la información disponible a la provincia de Zambézia, una región del país donde este tipo de análisis no había sido realizado con anterioridad. La principal contribución de los análisis univariantes y multivariantes llevados a cabo fue la corroboración de los datos de prevalencia discutidos anteriormente demostrando que los niños con sintomatología gastrointestinal no presentaban un mayor riesgo de infección por protistas que los niños asintomáticos. También se describieron patrones variables de infección/colonización por estos patógenos/comensales en función de la edad de los niños investigados, y se comprobó que tanto el tipo de agua de bebida como el contacto habitual con animales domésticos estaban asociados a un mayor riesgo de infección por algunas de estas especies de microorganismos.

El análisis univariante indicó que los niños con edades de 6 años o menos estaban significativamente más infectados por *Cryptosporidium* spp. que los niños de más edad. Aunque este resultado no pudo ser confirmado en el análisis multivariante debido al limitado número de casos positivos para este patógeno, sí coincide plenamente con los obtenidos en estudios previos en Mozambique (Knee *et al.*, 2018), incluyendo el proyecto GEMS (Kotloff *et al.*, 2013; Nhampossa *et al.*, 2015; Knee *et al.*, 2018; Acácio *et al.*, 2019), así como en otros países de África subsahariana (Feng y Xiao, 2011; Squire y Ryan, 2017). De nuevo, la inmadurez del sistema inmunológico de los niños de corta edad es una de las causas por las que este grupo poblacional es particularmente vulnerable a las infecciones por protozoos entéricos como *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* (DuPont, 2013; Laurent y Lacroix-Lamandé, 2017).

Por el contrario, las prevalencias tanto de *Blastocystis* sp. como de *E. dispar* tendían a incrementarse con la edad de los niños afectados, corroborando el mismo patrón acumulativo relacionado con la edad descrito anteriormente en los niños participantes en el estudio de Leganés. De forma conjunta, estos datos refuerzan la idea de que ambos protistas son en esencia simbioses comensales frecuentes en la microbiota intestinal humana (Scanlan y Marchesi, 2008). En este contexto, *E. dispar* muestra interesantes similitudes con *Blastocystis* sp. respecto a su potencial para causar daño en el tracto intestinal del hospedador. *Entamoeba dispar* comparte con *E. histolytica* la misma dotación de genes codificantes de factores de virulencia. Sin embargo, *E. histolytica* secreta entre 10 y 1,000 veces más cisteína proteasa que *E. dispar* (Reed *et al.*, 1989). Por otra parte, la capacidad de síntesis de la proteína formadora de poros (amebaporo) es un tercio menor en *E. dispar* que en *E. histolytica* (Leippe, 1997). Finalmente, *E. dispar* tiene una menor capacidad de adhesión al epitelio intestinal y un menor efecto citotóxico que *E. histolytica* (Dodson *et al.*, 1997). Por estos motivos, *E. dispar* ha sido considerada incapaz de generar daño tisular tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, otros estudios han demostrado la presencia de *E. dispar* en pacientes con colitis tanto disintérica (Graffeo *et al.*, 2014) como no disintérica (Gomes *et al.*, 1997), así como en pacientes con absceso hepático amebiano (Ximénez *et al.*, 2010). En base a esta evidencia, el carácter no patogénico universal de *E. dispar* ha sido recientemente cuestionado por algunos autores (Oliveira *et al.*, 2015). Es también destacable el hecho de que la única asociación significativa entre especies de protistas en el análisis multivariante era precisamente la de *E. dispar* con *Blastocystis* sp. Curiosamente, las asociaciones entre *Blastocystis* sp. y *G. duodenalis*, y *Blastocystis* sp. y *Cryptosporidium* spp. observadas en el estudio realizado en Leganés no fueron corroboradas en su homónimo en Zambézia.

La constatación de que el consumo de agua de ríos y manantiales como fuente primaria (o secundaria) de agua de bebida era un riesgo asociado a la infección/colonización por *G. duodenalis* y *E. dispar* tiene importantes connotaciones epidemiológicas y de salud pública. Esta idea era fuertemente reforzada por la demostración de que el tratamiento de agua mediante cloración o hervido reducía la exposición a *G. duodenalis* (aunque no a *E. dispar*). Estos datos ofrecen varias lecturas que deben ser cuidadosamente consideradas. En primer lugar, la transmisión de origen hídrico puede ser la principal vía de infecciones por protistas entéricos en Zambézia. En segundo lugar, las aguas superficiales en esta provincia parecen estar altamente contaminadas con las formas de resistencia de estos microorganismos. En tercer y último lugar, la asociación hallada para *E. dispar* (una especie solo presente en primates humanos y no humanos) es indicativa de que esta contaminación es mayoritariamente de origen antrópico. Desafortunadamente, no existe ningún estudio publicado en Mozambique sobre la presencia de protistas entéricos asociados a diarrea en muestras ambientales, incluidas aguas superficiales, que permita valorar la extensión y grado de veracidad de estas hipótesis. Aunque de forma indirecta, una reciente evaluación cuantitativa de riesgo microbiano ha estimado que el consumo de agua no tratada en Mozambique causa 2 millones de casos de criptosporidiosis y  $1.6 \times 10^5$  AVAD anualmente (Limaheluw *et al.*, 2019). En cualquier caso, estos datos corroboran los obtenidos en estudios previos en el país resaltando la necesidad urgente de mejorar las infraestructuras de acceso a agua potable y saneamiento para minimizar el riesgo de contaminación ambiental e infección por agentes transmitidos vía fecal-oral (Nhampossa *et al.*, 2015; Knee *et al.*, 2018; Acácio *et al.*, 2019). En este mismo contexto deben situarse los hallazgos aquí encontrados asociando la ausencia de letrina a una mayor probabilidad de colonización por *Blastocystis* sp. y *E. dispar*, o la baja calidad constructiva de la vivienda con un mayor riesgo de padecer infecciones por *G. duodenalis*. Otros estudios epidemiológicos basados en análisis de riesgos han demostrado que el consumo de agua no tratada estaba asociado a una mayor probabilidad de padecer infecciones por *G. duodenalis* o *Cryptosporidium* spp. en Egipto (Helmy *et al.*, 2014, 2015), Gambia (Hossain *et al.*, 2019) y Kenia (Wanyiri *et al.*, 2014). Ambos parásitos han sido también hallados en aguas de irrigación, aguas superficiales (canales, ríos, lagos) y subterráneas, aguas residuales, afluentes en plantas de tratamiento de agua potable, tanques de recogida de agua de lluvia, piscinas y aguas marinas costeras en diferentes países africanos (revisado por Squire y Ryan, 2017).

Finalmente, los resultados del análisis multivariante realizado indicaron que el contacto habitual con animales domésticos incluyendo perros, gatos y patos estaba

positivamente asociado con un mayor riesgo de infección por *G. duodenalis*, mientras que el contacto con patos incrementaba la probabilidad de colonización por *Blastocystis* sp. y *E. dispar*. Estos datos deben ser interpretados con cautela ya que, como se ha indicado anteriormente, la demostración de asociación no necesariamente implica causalidad. Por ejemplo, el contacto con patos no puede ser un factor de riesgo para *E. dispar* ya que el rango de hospedadores susceptibles a esta especie está restringido a humanos y otros primates, mientras que el pato y otras aves anseriformes solo pueden estar infectadas/colonizadas por la especie especialmente adaptada *Entamoeba anati* (Hooshyar et al., 2015). Sí sería correcto asumir, de forma más genérica, que los animales domésticos y de producción pueden actuar como potenciales fuentes de infección humana por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., como se ha sugerido en estudios epidemiológicos previos llevados a cabo en Costa de Marfil (Berrilli et al., 2012) y otros países africanos (revisado por Squire y Ryan, 2017). Al igual que en el caso de muestras ambientales, tampoco existen datos disponibles en Mozambique sobre la presencia de protistas entéricos en reservorios animales, lo que dificulta en gran medida la evaluación de la frecuencia con la que pueden ocurrir eventos de transmisión zoonótica. Ambas tareas deben ser priorizadas en estudios epidemiológicos futuros.

Respecto al microsporidio *E. bienensii*, la única asociación significativa encontrada (en el análisis univariante, pero no en el multivariante) fue su relación con *G. duodenalis*, al encontrarse el primero siempre en forma de coinfección con el segundo.

La comparación directa de los resultados obtenidos en los análisis multivariantes de asociación de riesgos llevados a cabo en las poblaciones pediátricas de Leganés y Zambézia permitieron extraer importantes conclusiones sobre la epidemiología de los protistas entéricos investigados en el presente trabajo. En primer lugar, en el estudio realizado en Leganés, tanto *G. duodenalis* como *Cryptosporidium* spp. estaban positivamente asociados con *Blastocystis* sp., sugiriendo una vía de infección común para las 3 especies. Esta posibilidad sería compatible con los eventos de transmisión persona-persona en los microfocos de naturaleza oportunista descritos anteriormente en los centros educativos investigados. Por el contrario, en Zambézia la única asociación de protistas identificada era la de *E. dispar* y *Blastocystis* sp., sugiriendo que las vías de infección debían de ser más variadas. Entre ellas, la transmisión de origen hídrica (y, por extensión, la alimentaria asociada al consumo de productos vegetales frescos no lavados o lavados con agua no tratada) desempeñaría un papel preponderante. La transmisión zoonótica animal-persona sería relevante en Zambézia, pero no en Leganés. En segundo lugar, los altos niveles de

infección/colonización detectados en los niños de Zambézia estarían estrechamente ligados a las deficientes infraestructuras de agua potable y saneamiento, y por lo tanto a las condiciones de pobreza y falta de recursos de esta región. En tercer lugar, la colonización por *Blastocystis* sp. tanto en niños de Leganés como de Zambézia seguía un patrón acumulativo común directamente proporcional a la edad, sugiriendo que este microorganismo es en esencia un simbionte comensal tanto en áreas de baja como de alta endemicidad. Por la misma razón, este comentario es extrapolable a *E. dispar* en Zambézia.

### Genotipado y subgenotipado

Actualmente, los estudios dirigidos a determinar la variabilidad molecular de especies de protistas entéricos asociadas a trastornos gastrointestinales son esenciales no solo para conocer su frecuencia y diversidad genética, sino también (como se pone de manifiesto en este trabajo) para determinar fuentes de infección, caracterizar vías de transmisión y estimar potencial zoonótico (Deplazes *et al.*, 2000; Feng y Xiao, 2011; Esch y Petersen, 2013; Ryan y Cacciò, 2013; Ryan *et al.*, 2014; Squire y Ryan, 2017). Éste es el estudio epidemiológico molecular basado en PCR y secuenciación más amplio y detallado realizado en población pediátrica asintomática en España hasta la fecha, contribuyendo a ello el elevado número de niños participantes y la adopción de una estrategia MLST para el genotipado y subgenotipado de especies como *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.

Tal y como se ha descrito anteriormente en esta sección, la presencia de protistas entéricos en poblaciones pediátricas en España ha sido investigada sobre todo mediante técnicas de detección convencionales incluyendo microscopía óptica, microscopía de inmunofluorescencia e inmunoensayos (ELISA, inmunocromatografía de flujo lateral) para la detección de antígenos parasitarios en heces o de anticuerpos específicos contra ellos circulantes en suero (Navarro-i-Martinez *et al.*, 2011; Carmena *et al.*, 2012; Köster y Carmena, 2020). Por el contrario, los estudios moleculares basados en PCR y secuenciación son mucho menos frecuentes. En el caso de *G. duodenalis*, el *assemblage* B (57%) era la variante genética del parásito más frecuente en población pediátrica (1–12 años) asintomática en Álava, seguido del sub-*assemblage* All (29%) y de infecciones mixtas All+B (14%) (Cardona *et al.*, 2011). Además, BIV fue el único sub-*assemblage* detectado en un estudio posterior en una población pediátrica (1–15 años) similar en la misma provincia (de Lucio *et al.*, 2017), así como en niños  $\leq 5$  años asistiendo a guarderías en Majadahonda, Madrid (Mateo *et al.*, 2014). Los datos de diversidad molecular para *G. duodenalis* identificados en este trabajo (All: 17%; BIV: 79%; BIII/BIV: 4%,  $n = 24$ ) concuerdan con los

descritos en los estudios previos antes citados, corroborando que el assemblage B es 2–3 veces más frecuente que el assemblage A en niños aparentemente sanos en la CAM y otras regiones españolas. Todavía más destacable es el hecho de que esta frecuencia de genotipos del parásito era también muy similar (All: 15%; BIV: 62%; BIII/BIV: 1.6%,  $n = 124$ ) a la identificada previamente en pacientes clínicos de todos los grupos etarios (niños  $\leq 12$  años: 66%) con giardiosis atendidos en dos hospitales públicos de la CAM (de Lucio *et al.*, 2015). No es coincidencia (ver sección 3.1.) que uno de esos centros era el Hospital Universitario Severo Ochoa, cuya área de cobertura sanitaria incluía precisamente todo el municipio de Leganés. Este hecho permitía la comparación directa de los datos de frecuencia y diversidad genotípica de *G. duodenalis* (y *Cryptosporidium* spp., ver debajo) en población pediátrica con y sin manifestaciones clínicas en la misma área geográfica y en periodos de tiempo (síntomáticos: 2013–15; asintomáticos: 2017–18) próximos. Debe destacarse además que estas similitudes eran también observables a nivel de secuencias nucleotídicas y distribución de SNPs en los marcadores genéticos *gdh* y *bg* (*tpi* no fue usado en la población clínica).

La preponderancia del assemblage B sobre el assemblage A ha sido también identificada en otros estudios con pacientes sintomáticos ambulatorios de todos los grupos etarios en España. Es el caso de un estudio realizado en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (Santiago de Compostela) entre 2000–2010 (A: 5%; B: 93%; A+B: 2%,  $n = 119$ ) (Gabín-García *et al.*, 2017), y el de un trabajo más reciente en el que se reclutaron pacientes de 10 provincias españolas entre 2012–2018 (A: 30%; B: 70%,  $n = 95$ ) (Wang *et al.*, 2019). En este último trabajo se halló además que los niños participantes estaban significativamente más infectados por el *assemblage* B que los adultos (83% vs. 52%), mientras que las infecciones asintomáticas eran más comunes en individuos con *assemblage* A que en individuos con *assemblage* B (14% vs. 1.5%). Finalmente, los *assemblages* A y B han sido encontrados en idénticas proporciones (All: 44%; All/AIII: 6%; BIII: 19%; BIV: 31%,  $n = 16$ ) en La Rioja (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017). Esta variación en la frecuencia de genotipos en función del área geográfica considerada puede ser indicativa de diferentes fuentes de infección o de rutas de transmisión del parásito.

En este estudio, la presencia de *Cryptosporidium* spp. ha sido confirmada en una pequeña proporción (< 1%) de los niños asintomáticos investigados, demostrándose que *C. hominis* era mucho más prevalente que *C. parvum* (71% vs. 21%,  $n = 14$ ). Los datos moleculares previos disponibles en poblaciones pediátricas españolas análogas son muy limitados, siendo *C. hominis* la única especie de *Cryptosporidium* detectada en niños (1–12 años) aparentemente sanos en la provincia de Álava (Cardona *et al.*, 2011). La información es

más amplia en niños con manifestaciones clínicas, principalmente diarrea. Así, *C. hominis* era mucho más prevalente que *C. parvum* (67% vs. 33%) tanto en niños inmunocompetentes como VIH positivos en Zaragoza (Llorente *et al.*, 2007). *Cryptosporidium hominis* (IaA24R3,  $n = 6$ ; IbA10G2,  $n = 41$ ) también era más frecuentemente detectado que *C. parvum* (IIaA15G1R1,  $n = 1$ ; IIaA15G2R1,  $n = 2$ ) en niños con síntomas gastrointestinales en esta última provincia (Ramo *et al.*, 2015). Por el contrario, *C. parvum* era ligeramente más prevalente que *C. hominis* (53% vs. 47%) en niños con diarrea aguda  $\leq 7$  años en Málaga (Martín-Ampudia *et al.*, 2012).

La misma tendencia ha sido descrita en poblaciones clínicas de todas las edades incluyendo principalmente individuos inmunocompetentes, pero también pacientes VIH positivos en algunos casos. Así, *C. hominis* ha sido más frecuentemente identificado que *C. parvum* en Barcelona (88% vs. 10%,  $n = 69$ ) (Segura *et al.*, 2015), Galicia (65% vs. 34%,  $n = 486$ ) (Abal-Fabeiro *et al.*, 2015), La Rioja (82% vs. 19%,  $n = 81$ ) (Azcona-Gutiérrez *et al.*, 2017), y Madrid (83% vs. 17%,  $n = 12$ ), pero no en A Coruña (35% vs. 65%,  $n = 58$ ) (Navarro-I-Martínez *et al.*, 2013). De forma global, estos estudios clínicos revelaron que las familias genotípicas (usando como referencia el marcador molecular *gp60*) más frecuentes en España eran la Ib (predominantemente el genotipo IbA10G2) y IIa (predominantemente el genotipo IIaA15G2R1) en *C. hominis* y *C. parvum*, respectivamente.

A destacar, en un estudio multicéntrico reciente realizado en la CAM en la que participaba el Hospital Universitario Severo Ochoa, *C. hominis* también fue más frecuentemente hallado que *C. parvum* (82% vs. 13%,  $n = 110$ ) en el periodo 2013–15, donde el 73% de los casos de criptosporidiosis ocurrieron en niños  $\leq 4$  años (de Lucio *et al.*, 2016b). Estos porcentajes son similares a los identificados en los niños asintomáticos de este estudio (71% vs. 21%,  $n = 14$ ). Considerando de forma conjunta estos datos junto a los mencionados anteriormente para *G. duodenalis*, la diversidad y frecuencias tanto de *assemblages* y sub-*assemblages* de *G. duodenalis* como de familias y genotipos de *Cryptosporidium* spp. eran muy parecidas en niños sintomáticos y asintomáticos en Leganés. Este hecho sugiere, por lo tanto, que el genotipo de estos parásitos no era un factor esencial en la transición de infección a enfermedad.

Por otra parte, *C. hominis* ha sido la única especie detectada hasta el momento en brotes de criptosporidiosis asociados a diarrea en España. Los genotipos IaA11R2 ( $n = 5$  y IbA10G2R2 ( $n = 1$ ) fueron identificados en un brote en una guardería de Granada que afectó a 7 niños  $\leq 4$  años (Goñi *et al.*, 2015). Los genotipos IaA18R3 ( $n = 7$ ) y IbA10G2R2 ( $n = 28$ )

estaban implicados en un brote en Navarra en el que se vieron afectados 162 niños de hasta 14 años, el 77% de ellos  $\leq 4$  años (Fuentes *et al.*, 2015).

Otras especies de *Cryptosporidium* han sido esporádicamente descritas en España. Así, *C. ubiquitum* ha sido identificado en un niño inmunocompetente en León, y *C. felis* en un individuo adulto VIH positivo en Zaragoza (Cieloszyk *et al.*, 2012). Esta última especie también ha sido encontrada en un niño de 4 años adoptado procedente de India (Llorente *et al.*, 2006), en un niño inmunocompetente en Zaragoza (Llorente *et al.*, 2007) y en otro con sintomatología clínica en Madrid (de Lucio *et al.*, 2016b). *Cryptosporidium cuniculus* fue identificado en una niña de 7 años con diarrea aguda en Madrid (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Finalmente, *C. meleagridis* ha sido descrito en 2 niños inmunocompetentes en Zaragoza y A Coruña (Llorente *et al.*, 2007; Navarro-I-Martinez *et al.*, 2013) y en un niño VIH positivo en Madrid (Navarro-I-Martinez *et al.*, 2013). El hallazgo ocasional de *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. cuniculus* (especies adaptadas a infectar félidos, aves y lagomorfos, respectivamente) indica claramente eventos de transmisión zoonótica de naturaleza oportunista en individuos con un sistema inmunológico inmaduro (niños) o comprometido (pacientes VIH positivos). *Cryptosporidium ubiquitum* es una especie con un rango de hospedadores más amplio, incluido el hombre (Blanco *et al.*, 2016; Higuera *et al.*, 2020).

De forma global, la predominancia de *C. hominis* tanto en poblaciones asintomáticas como clínicas de todos los grupos etarios en la mayoría de las regiones investigadas sugiere que la transmisión de *Cryptosporidium* spp. en España es mayoritariamente de origen antrópico. Sin embargo, existen diferencias en la distribución de esta especie en función del área geográfica objeto de estudio. Por ejemplo, en regiones con una alta actividad ganadera la frecuencia de *C. parvum* (una especie comúnmente hallada en terneros, ver sección 1.11.2) se acerca o incluso supera a la de *C. hominis*, indicando que un porcentaje significativo de los casos de criptosporidiosis humana identificados en estas zonas tienen un origen zoonótico (Navarro-I-Martinez *et al.*, 2013; Abal-Fabeiro *et al.*, 2015). Esta misma situación ha sido previamente descrita en áreas rurales en EEUU (Feltus *et al.*, 2006), Holanda (Wielinga *et al.*, 2008), Irlanda (Zintl *et al.*, 2009) y Reino Unido (Chalmers *et al.*, 2009).

Este trabajo constituye el mayor estudio epidemiológico molecular realizado en España describiendo la frecuencia y diversidad molecular de *Blastocystis* sp. en población pediátrica asintomática. En Europa, más del 95% de los casos genéticamente caracterizados de colonización/infección por *Blastocystis* sp. estaban asociados a los ST1-ST4 (Alfellani *et al.*, 2013a). Ésta es también la situación del presente estudio, donde ST2 (36%) era la variante genética del microorganismo más frecuentemente hallada, seguida de ST1 (23%), ST3 (22%) y

ST4 (19%) y ST8 (1%). De forma conjunta estos datos proporcionan evidencia molecular sugiriendo que la transmisión de *Blastocystis* sp. en la población pediátrica asintomática de Leganés era mayoritariamente de origen antrópico. Esta distribución de frecuencia genotípicas era muy similar a la reportada previamente en estudio comunitario ( $n = 179$ ) llevado a cabo en Álava (Paulos *et al.*, 2018), aunque en este último trabajo ST2 (62%) era el subtipo dominante. En ambos estudios ST4 estaba mucho menos representado (7–19%) que ST1-ST3. Precisamente ST4 ha sido identificado como el principal subtipo (94%) de *Blastocystis* sp. en pacientes mono infectados con diarrea en un estudio previo llevado a cabo en Valencia (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009). Además, en un estudio multicéntrico realizado entre 2018 y 2019 en el que participaban 5 centros hospitalarios de la CAM, La Rioja y la Comunidad Valenciana, la frecuencia relativa de ST4 era superior en pacientes con diarrea que la atribuible a ST1-ST3 (Köster *et al.*, 2019). Resultados similares han sido hallados en pacientes con diarrea aguda en Dinamarca (Stensvold *et al.*, 2011a) y en pacientes con SII y/o diarrea crónica en Italia (Mattiucci *et al.*, 2016). En ausencia de estudios de casos y controles adecuados, estos datos sugieren que ST4 puede ser un subtipo de *Blastocystis* sp. particularmente asociado a patogenicidad y virulencia. Apoyando esta hipótesis, se ha propuesto que la aparición de ST4 en poblaciones humanas es el resultado de un salto interespecies (probablemente a partir de roedores) reciente en términos evolutivos y que tuvo lugar en Europa (Stensvold, 2012; Alfellani *et al.*, 2013a). La falta de adaptación de ST4 al “nuevo” hospedador humano podría por lo tanto traducirse en un incremento en su potencial patogénico. Aunque atractiva, esta hipótesis debe ser considerada como preliminar, ya que otros estudios epidemiológicos no han confirmado esta supuesta asociación entre ST4 y enfermedad (Meloni *et al.*, 2011; Seyer *et al.*, 2017), o incluso la han propuesto para otros subtipos de *Blastocystis* sp. Es el caso por ejemplo de ST1, asociado a SII en pacientes en Egipto (Fouad *et al.*, 2011), o ST3, asociado a diversos trastornos digestivos incluyendo diarrea (Tan *et al.*, 2008).

En comparación con ST1-ST4, los subtipos de *Blastocystis* sp. ST5-ST9 y ST12 son infrecuentemente hallados en el hombre (Alfellani *et al.*, 2013a). En el presente estudio ST8 ha sido identificado en una niña de 10 años sin historial de contacto previo con animales domésticos y sin exposición aparente a otros factores de riesgo asociados a patógenos intestinales, por lo que la fuente de infección es desconocida. La colonización por ST8 ha sido previamente descrita casi exclusivamente en primates no humanos en cautividad y de vida libre en Centroamérica (Helenbrook *et al.*, 2015; Villanueva-García *et al.*, 2017), Sudamérica (Valença-Barbosa *et al.*, 2019; Oliveira-Arbex *et al.*, 2020) y Europa (Stensvold *et al.*, 2009). Es

destacable mencionar que ST8 ha sido descrito precisamente tanto en primates no humanos en cautividad como en sus cuidadores en un zoológico de Reino Unido, muy probablemente como consecuencia de eventos de transmisión zoonótica (Stensvold *et al.*, 2009).

Como se ha indicado anteriormente, el microsporidio *E. bienewsi* no fue identificado en ninguno de los niños asintomáticos investigados en Leganés. En el único estudio de caracterización molecular de *E. bienewsi* llevado a cabo en España hasta la fecha en humanos, el genotipo D del parásito ha sido detectado en dos pacientes HIV negativos con trasplante de órgano sólido en Gran Canaria (Galván *et al.*, 2011).

Respecto a la población pediátrica asintomática y sintomática investigada en Zambézia, este estudio es el primero de su clase en ofrecer datos moleculares sobre los genotipos circulantes de las principales especies de protistas entéricos asociados a diarrea en esta provincia. Debido a su escasez, este tipo de trabajos son prioritarios en la gran mayoría de países africanos incluido Mozambique. Ésta es, probablemente, la principal contribución del presente estudio al conocimiento actual de la epidemiología de estos patógenos.

La única información actualmente disponible sobre el genotipado de *G. duodenalis* en Mozambique proviene de una investigación realizada en pacientes con VIH y/o TB en el distrito de Chowke (Irisarri-Gutiérrez *et al.*, 2017). En ese trabajo se identificó el sub-*assemblage* All del parásito en un hombre de 42 años con VIH, mientras el sub-*assemblage* BIV fue detectado en una niña de un año también con VIH, datos a todas luces insuficientes para caracterizar la epidemiología molecular de *G. duodenalis* en el país. El presente estudio confirmó la predominancia del *assemblage* B del parásito (A: 7%; B: 88%; A+B: 5%,  $n = 43$ ) en la población pediátrica estudiada, en línea con los resultados obtenidos en la mayoría de los países africanos donde esta información está disponible (ver Anexo III). No se observaron diferencias en la distribución de los genotipos del parásito entre niños asintomáticos y niños con manifestaciones clínicas. Así, el *assemblage* B ha sido identificado en frecuencias > 80% en Egipto (Soliman *et al.*, 2011), Etiopía (de Lucio *et al.*, 2016a), Guinea-Bisáu (Ferreira *et al.*, 2012), Kenia (Mbae *et al.*, 2016), Marruecos (El Fatni *et al.*, 2014), Ruanda (Ignatius *et al.*, 2012) y Tanzania (Forsell *et al.*, 2016).

Confirmando estudios epidemiológicos moleculares previos realizados por diversos grupos de investigación, incluyendo el LRIP, en poblaciones predominantemente pediátricas en países africanos como Angola (Dacal *et al.*, 2018), Egipto (Soliman *et al.*, 2011), Etiopía (Gelaneu *et al.*, 2007; Flecha *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2016a), Kenia (Mbae *et al.*, 2016) y Uganda (Ankarklev *et al.*, 2012a), el presente estudio ha puesto de manifiesto la

extraordinaria variabilidad genética del *assemblage* B de *G. duodenalis* también en Mozambique. Este hecho era particularmente evidente en los marcadores genéticos *gdh* y *bg*, en los que virtualmente todas las secuencias identificadas como BIII, BIV, o BIII/BIV eran diferentes entre ellas. Estas secuencias contenían un elevado número de posiciones ambiguas, identificables como dobles picos durante la inspección visual de los correspondientes cromatogramas, que hacían difícil su asignación a un sub-*assemblage* (BIII o BIV) concreto. Este hecho justificaba la elevada proporción de secuencias identificadas como BIII/BIV. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar la presencia de dobles picos. El primero de ellos implicaría la existencia de infecciones mixtas BIII+BIV. Bajo este criterio, cada doble pico detectado identificaría la posición exacta en la que, una vez alineadas, las secuencias BIII y BIV diferían. Esta posibilidad es compatible con escenarios epidemiológicos de elevada incidencia como el descrito en Zambézia e implicaría que muchas de las secuencias clasificadas como BIII/BIV corresponderían en realidad a coinfecciones BIII+BIV. La segunda posibilidad, aún más atractiva, implicaría la existencia de recombinación genética asociada a valores reducidos de heterocigosidad en las frecuencias alélicas (ASH) (Morrison *et al.*, 2007; Franzén *et al.*, 2009). Como en el caso de otros diplomonádidos binucleados, *G. duodenalis* ha sido largamente considerada como un organismo de reproducción asexual (clonal) estricta. Bajo esta premisa, las dos copias alélicas presentes para un determinado locus tenderían a divergir con el tiempo, incrementando su ASH como consecuencia directa de la acumulación de mutaciones independientes en sus respectivas secuencias (Sprong *et al.*, 2009). Definitivamente, este no es el caso del *assemblage* A de *G. duodenalis*, caracterizado por valores de ASH muy bajos (0,01%) (Morrison *et al.*, 2007). Este dato ha sido confirmado en aislados pertenecientes a los sub-*assemblages* AI y AII del parásito y también, aunque en mucha menor medida, en aislados identificados como *assemblage* B (Teodorovic *et al.*, 2007). Evidencia adicional de recombinación genética ha sido obtenida en estudios posteriores tanto a nivel experimental (Ankarklev *et al.*, 2012b) como poblacional (Siripattanapipong *et al.*, 2011). De forma conjunta, estos datos sugieren la existencia de algún tipo de mecanismo de homogenización genética en *G. duodenalis*. Entre los propuestos figuran la recombinación intragénica, el intercambio intra-alélico de secuencias o la fusión de los dos núcleos del parásito en el estadio quístico o diplomixis (Cooper *et al.*, 2007; Sprong *et al.*, 2009; Ankarklev *et al.*, 2010). La contribución exacta de estos mecanismos a la diversidad genética de *G. duodenalis* es actualmente desconocida. En el caso de infecciones mixtas, la clonación de los amplicones sospechosos mediante técnicas de transformación y selección bacteriana, así como las técnicas de secuenciación masiva (NGS), pueden ser de gran ayuda para la identificación de variantes genéticas

subrepresentadas en la población investigada no detectables mediante PCR y secuenciación Sanger (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2009; Kosuwin *et al.*, 2010). Esta tecnología no ha sido empleada en el presente estudio, pero sería interesante hacerlo en muestras seleccionadas en trabajos futuros.

En este trabajo no se han detectado *assemblages* (C-G) de *G. duodenalis* específicos de especies hospedadoras no humanas en la población pediátrica investigada. Sin embargo, el *assemblage* C (adaptado a infectar cánidos) ha sido descrito en un paciente oncológico inmudeprimido con diarrea en Egipto (Soliman *et al.*, 2011), mientras que el *assemblage* F (adaptado a infectar félidos) ha sido identificado en 6 individuos con diarrea y 1 asintomático en Etiopía (Gelaneu *et al.*, 2007). Por último, el *assemblage* E (adaptado a infectar ungulados) ha sido hallado en tres estudios independientes en Egipto, siendo el único genotipo del parásito encontrado en uno de ellos (Foronda *et al.*, 2008; Helmy *et al.*, 2014; Abdel-Moein *et al.*, 2016).

Respecto a *Cryptosporidium* spp., este estudio ha confirmado la presencia de 4 especies del parásito circulando en la población pediátrica de Zambézia, incluyendo *C. hominis* (31%), *C. parvum* (31%), *C. felis* (31%) y *C. viatorum* (7%). No se observaron diferencias en la distribución de *C. hominis* y *C. parvum* entre niños asintomáticos y niños con manifestaciones clínicas, mientras que *C. felis* y *C. viatorum* fueron hallados solo en niños aparentemente sanos. *Cryptosporidium hominis* y *C. parvum* también han sido encontrados en idénticas proporciones (42%) en un trabajo previo realizado en pacientes adultos con diarrea en Maputo en el que también se identificó un caso (14%) de criptosporidiosis por *C. felis* (Casmó *et al.*, 2018). En África, *C. hominis* (~70%) es la especie de *Cryptosporidium* mas frecuentemente reportada en poblaciones humanas, seguida de *C. parvum* (~23%) y *C. meleagridis* (~2%) (revisado en Squire y Ryan, 2017 y Anexo V). Además de las especies antes mencionadas, también han sido descritas infecciones esporádicas por *C. ubiquitum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. muris*, *C. suis* y *C. xiaoi*, mayoritariamente en individuos inmunocomprometidos y niños (revisado en Squire y Ryan, 2017).

De interés, 3 de las 4 infecciones por *C. parvum* correspondían al “genotipo bovino”, también denominado por algunos autores como *C. pestis* (Slapeta, 2006), del parásito. Aunque esta variante genética de *C. parvum* puede ser transmitida de forma directa persona-persona (Casemore y Jackson, 1984), la posibilidad de un origen zoonótico no era en absoluto descartable. Éste era definitivamente el caso de *C. felis*, un taxón específicamente adaptado a infectar félidos en general y gatos en particular. El hecho de que *C. felis* haya sido detectado en igual frecuencia que *C. hominis* y el “genotipo bovino” de *C. parvum* es

indicativo de que los animales domésticos en Zambézia eran fuente frecuente de infección humana. Estos datos deben interpretarse en el contexto de las asociaciones de riesgo descritas anteriormente para *G. duodenalis* (contacto habitual con patos, perros y gatos) y *Blastocystis* sp. (contacto habitual con patos). En África, *C. felis* ha sido previamente documentado en pacientes con VIH en Etiopía (Adamu *et al.*, 2014) y Nigeria (Akinbo *et al.*, 2010), en niños de áreas urbanas desfavorecidas en Nairobi, Kenia (Mbae *et al.*, 2015) y en pacientes diagnosticados mediante ensayos rutinarios en laboratorios clínicos de este último país (Gatei *et al.*, 2006).

La presencia de *C. viatorum* en población pediátrica es también destacable. Esta especie, inicialmente descrita en viajeros con diarrea provenientes del subcontinente indio (Elwin *et al.*, 2012) ha sido considerada desde entonces como específica de humanos. Sin embargo, estudios recientes realizados en Australia (Koehler *et al.*, 2018) y China (Chen *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019) han demostrado que *C. viatorum* también puede infectar roedores, abriendo la posibilidad a eventos de transmisión zoonótica. En África, esta especie de *Cryptosporidium* ha sido previamente identificada en niños mayoritariamente asintomáticos y pacientes con manifestaciones clínicas y con VIH en Etiopía (Adamu *et al.*, 2014; Stensvold *et al.*, 2015; de Lucio *et al.*, 2016a) y en población adulta en Kenia (Stensvold *et al.*, 2015).

Desafortunadamente, ninguna de las muestras caracterizadas en este estudio como *C. hominis* o *C. parvum* en el marcador *ssu* rARN pudo ser amplificada y analizada en el marcador *gp60*, por lo que los subgenotipos implicados en estas infecciones son desconocidos. Los estudios epidemiológicos moleculares previos realizados en diversas poblaciones humanas en África han revelado que la transmisión de la criptosporidiosis en este continente es principalmente de origen antroponótico. Así, las familias de subtipos Ia, Ib, Id y Ie de *C. hominis* representaron hasta el 58% de todos los aislados de *Cryptosporidium* genotipados, mientras que en *C. parvum* fueron IIc y IIe (revisado en Ryan y Square, 2017 y Anexo V). A pesar de la escasa información disponible, ésta parece también la situación en Mozambique, donde el subtipo IIcA5G3 fue el más frecuentemente hallado en población pediátrica con diarrea en Manhica (Sow *et al.*, 2016), mientras que los subtipos IaA23R3, IIcA5G3d, y IIeA12G1 han sido descritos en adultos con diarrea en Maputo (Casmó *et al.*, 2018).

Este estudio proporciona la primera descripción sobre la epidemiología molecular de *Blastocystis* sp. en Mozambique hasta el momento actual. En trabajos previos llevados a cabo en otros países africanos, ST1-ST3 eran los subtipos predominantes (88%, rango: 60–100%) en los casos humanos molecularmente caracterizados (datos extraídos del Anexo VIII). Por su

parte, ST4 ha sido identificado mucho menos frecuentemente en frecuencias genotípicas del 12–14% en Liberia y Nigeria (Alfellani *et al.*, 2013a) y del 2% en Senegal (El Safadi *et al.*, 2014) y Túnez (Ben Abda *et al.*, 2017). ST4 tiene un marcado patrón de distribución geográfica, siendo relativamente frecuente en Europa, pero raro o incluso ausente en muchos países del continente americano y África (Alfellani *et al.*, 2013a; Jiménez *et al.*, 2019). Este hecho, unido a una estructura genética poblacional preponderantemente clonal (esto es, sin divergencia evolutiva por acumulación de mutaciones), sugiere que la aparición de ST4 en poblaciones humanas representa una adquisición reciente en un momento evolutivamente cercano (Stensvold, 2012; Alfellani *et al.*, 2013a). Esta adquisición debió de tener lugar en Europa, expandiéndose gradualmente a otras áreas geográficas en el mundo.

Los datos moleculares hallados en la población pediátrica investigada en Zambézia (ST1: 23%, ST2: 23%, ST3: 45%, ST4: 9%) coinciden por lo tanto con las frecuencias genotípicas documentadas en otros países africanos. Al igual que en el caso de las infecciones por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., no se observó ninguna diferencia en la distribución de estos subtipos y sus alelos asociados en función de la presencia o no de síntomas gastrointestinales en los niños participantes. No se detectó sin embargo la presencia de STs infrecuentes en humanos (ST5-ST9) o considerados como especialmente adaptados a colonizar/infectar especies animales no humanas (ST10-ST17, ST21, ST23-ST26). En este sentido, conviene destacar que ST7, un subtipo particularmente frecuente en aves tanto domésticas como de vida libre y, en mucha menor medida, en mamíferos (Wang *et al.*, 2018a; Maloney *et al.*, 2020) ha sido descrita en diversas poblaciones humanas (media: 4%, rango: 1–14%) en Angola (Dacal *et al.*, 2018), Egipto (Hussein *et al.*, 2008; Alfellani *et al.*, 2013a), Libia (Alfellani *et al.*, 2013a), Nigeria (Poulsen *et al.*, 2016), Tanzania (Forsell *et al.*, 2016) y Túnez (Ben Abda *et al.*, 2017). Aunque de forma indirecta, estos datos apoyarían la asociación de riesgo encontrada en el presente estudio entre *Blastocystis* sp. y el contacto habitual con patos. Finalmente, ST5 (frecuente en suínos) ha sido identificado de forma esporádica en niños asintomáticos en Angola (Dacal *et al.*, 2018) y ST6 (frecuente en aves de corral) en Egipto (Hussein *et al.*, 2008; Alfellani *et al.*, 2013a), reforzando aún más el origen zoonótico de estas infecciones/colonizaciones.

Al igual que en el caso de *Blastocystis* sp., este trabajo constituye el primer estudio epidemiológico molecular describiendo la frecuencia y diversidad genérica del microsporidio *E. bienersi* en poblaciones humanas en Mozambique. A pesar del limitado número de muestras positivas obtenidas ( $n = 3$ ), todas ellas pertenecían a diferentes genotipos del patógeno: Peru11, S2 y Type IV. Un cuarto genotipo de *E. bienersi* no descrito hasta ahora, denominado HhMzEb1, ha sido también identificado de forma paralela en este estudio en

Maputo en colaboración con el Centro de Investigação em Saúde de Manhiça en esa provincia (Muadica *et al.*, 2020c). Estos 4 genotipos se encuadran en el Grupo 1, que incluye variantes genéticas de *E. bienesi* de baja especificidad en cuanto al rango de hospedadores susceptibles (Santín y Fayer, 2009). Estos genotipos infectan, además de al hombre, a una amplia diversidad de otras especies de animales tanto domésticas como de vida libre, teniendo por lo tanto potencial zoonótico (Li *et al.*, 2019a,b; Santín y Fayer, 2009). El hallazgo del genotipo S2 es el segundo que se describe en humanos a nivel mundial, tras ser identificado por primera vez en 3 niños (dos VIH positivos, uno VIH negativo) y 8 adultos VIH positivos en Malawi (ten Hove *et al.*, 2009). Por otra parte, el genotipo Type IV (también reportado en otros estudios como K, Peru2, BEB5, CMITS1, BEB-var, y PtEB III) ha sido frecuentemente identificado en diversas poblaciones humanas a nivel global (Sulaiman *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2013a). En África, Type IV ha sido documentado en Camerún (Sarfati *et al.*, 2006; Breton *et al.*, 2007), Gabón (Breton *et al.*, 2007), Malawi (ten Hove *et al.*, 2009), Níger (Esporn *et al.*, 2007), Nigeria (Ayinmode *et al.*, 2011; Akinbo *et al.*, 2012; Maikai *et al.*, 2012), Santo Tomé y Príncipe (Lobo *et al.*, 2014) y Uganda (Tumwine *et al.*, 2002). Además, Type IV también ha sido encontrado en una gran diversidad de animales incluyendo primates no humanos, bovinos, perros, gatos, roedores, aves y reptiles, así como en aguas superficiales (Graczyk *et al.*, 2009; Ben Ayed *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que tanto la transmisión hídrica como el contacto directo animal-persona son vías plausibles de infección humana por *E. bienesi* en áreas endémicas. De hecho, *E. bienesi* ha sido implicado, de forma concurrente con otros patógenos, en un brote de enfermedad gastrointestinal en un hospital pediátrico en China (Wang *et al.*, 2013b). Finalmente, este estudio representa la primera identificación de una infección humana por el genotipo Peru11 (anteriormente denominado Peru12) en África, aunque esta variante genética ya había sido descrita en este continente en babuinos en cautividad en Kenia (Li *et al.*, 2011) y fuera de él en poblaciones humanas en Asia (p.e. Leelayoova *et al.*, 2006) y Suramérica (p.e. Sulaiman *et al.*, 2003a).

En este estudio, basado en ITS-PCR y secuenciación Sanger, no se han detectado infecciones mixtas involucrando diferentes genotipos de *E. bienesi*. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que estas coinfecciones son relativamente frecuentes en áreas de alta endemicidad. Es el caso de un estudio realizado en niños con diarrea en Uganda usando microsatélites como marcador molecular, seguido de clonación y secuenciación de los amplicones obtenidos (Widmer *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que, debido a posibles

limitaciones de sensibilidad diagnóstica, en este estudio no se hayan podido detectar los genotipos circulantes del parásito menos representados en la población pediátrica estudiada.

La comparación directa de los resultados obtenidos en los análisis moleculares dirigidos a determinar la diversidad molecular de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* y *E. bieneusi* en las poblaciones pediátricas de Leganés y Zambézia permitieron extraer importantes conclusiones. En primer lugar, la diversidad de protistas entéricos (tanto en especies como en variantes genéticas) era mucho mayor en los niños de Zambézia que en los niños de Leganés. Este hecho obedecería a las condiciones epidemiológicas de alta endemicidad asociadas a elevadas tasas de infección y reinfección de Mozambique. En el caso de las infecciones por *G. duodenalis* detectadas en este último país, la extraordinaria variabilidad molecular observada en el *assemblage* B del parásito puede ser parcialmente explicada por la existencia de eventos de recombinación genética. En segundo lugar, no se hallaron diferencias observables en la distribución de especies/genotipos de los protistas objeto de estudio en las poblaciones de niños sintomáticos y asintomáticos analizadas tanto en Leganés como en Zambézia, sugiriendo que la variante genética del parásito/comensal no es esencial para desencadenar la enfermedad y los síntomas a ella asociados. En el caso de los niños participantes en Leganés, esta conclusión ha sido inferida de forma indirecta por comparación con datos clínicos disponibles de otros estudios ya realizados o actualmente en curso desde el LRIP. En tercer lugar, los animales domésticos constituyen una fuente significativa de infecciones humanas por protistas entéricos (confirmadas para *Cryptosporidium* spp., sospechadas para *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp.) en Zambézia, pero no en Leganés. Estos datos corroborarían el escenario de alta endemicidad y elevada contaminación ambiental descrito anteriormente. En cuarto y último lugar, este estudio pone de manifiesto la urgencia de promover estudios moleculares dirigidos a determinar la presencia y diversidad molecular de estos patógenos en muestras de origen animal y medioambiental, esenciales para identificar fuentes de infección y vías de transmisión.

### **Fortalezas y limitaciones**

Entre las fortalezas de este estudio destacan el cuidadoso diseño muestral efectuado (incluyendo criterios de inclusión/exclusión precisos y rigurosamente implementados), el uso de encuestas epidemiológicas específicamente diseñadas bajo la supervisión de expertas epidemiólogas internacionales, el elevado número de niños participantes y de muestras analizadas y el empleo de técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación (incluyendo

MLST en algunos casos) para la identificación, confirmación y genotipado de los protistas entéricos objeto de estudio.

Este trabajo presenta, sin embargo, una serie de limitaciones que deben ser consideradas para la correcta interpretación tanto de los resultados obtenidos como de las conclusiones alcanzadas. Respecto al diseño muestral empleado, los centros educativos que accedieron a participar en el estudio no necesariamente eran representativos de la población escolar general en el municipio de Leganés y en la provincia de Zambézia. Sesgos como la predominancia de centros públicos sobre centros concertados o privados, o la subrepresentación de ciertas zonas pueden haber afectado a los resultados obtenidos. La voluntariedad del estudio puede haber promovido la participación de familias con menores recursos o un mayor riesgo percibido de infección. Por el contrario, individuos sanos, pero excesivamente preocupados por su salud, pueden haber tenido un mayor interés en participar y haber contribuido a diluir las prevalencias obtenidas. Estos efectos distorsionadores pueden haber sido amplificadas en aquellos centros con menores tasas de participación. Por otra parte, el diseño transversal del estudio no ha permitido analizar patrones de infección asociados a la estacionalidad. Finalmente, hay que tener muy presente que en este estudio no se ha investigado la presencia de patógenos entéricos de origen bacteriano o vírico, por lo que su efecto sinérgico sobre los protistas aquí considerados (y viceversa) no han sido evaluados. Además, estos patógenos no parasitarios pueden haber actuado como factores de confusión en la identificación de manifestaciones clínicas asociadas a las infecciones por protistas.

Respecto a los análisis de asociación de riesgos, el limitado número de muestras positivas para algunos patógenos (p.e. *E. bienensii*) se ha visto reflejado en la amplitud de los intervalos de confianza obtenidos, comprometiendo la certidumbre de las estimaciones estadísticas asociadas. Este hecho, junto con la falta de información detallada para alguna de las variables consideradas en el conjunto de datos procedente de Mozambique (p.e. localización de letrina dentro o fuera de la vivienda), no permitió determinar en profundidad el grado de asociación de éstas.

Respecto a las herramientas moleculares empleadas, las diferencias de sensibilidad diagnóstica entre las técnicas de PCR utilizadas (directa, semianidada, anidada, qPCR) muy probablemente se reflejaron en variaciones en la capacidad de detectar los protistas entéricos investigados, por lo que las prevalencias de algunos de ellos (p.e. *Blastocystis* sp.) pueden estar subestimadas. Estas diferencias explican, en gran medida, el relativo bajo número de muestras positivas a *G. duodenalis* o *Cryptosporidium* spp. que fueron

satisfactoriamente genotipadas a nivel de *assemblage*/sub-*assemblage* y familias de subtipos, respectivamente. Así, en el caso de *G. duodenalis*, la técnica de cribado usada para la detección del parásito era qPCR, que usa como marcador el gen multicopia *ssu* rARN del parásito. Por el contrario, las técnicas de genotipado/subgenotipado utilizadas (*gdh*-PCR, *bg*-PCR y *tpi*-PCR) estaban todas ellas basadas en la amplificación de genes de copia única, mucho menos sensibles que *ssu* rARN. Por este motivo solo las muestras positivas a *G. duodenalis* con un valor de Ct en qPCR < 30 en Leganés (ver sección 4.4.1.) y < 32 en Zambézia (ver sección 4.5.1.) fueron consideradas para su genotipado/subgenotipado. La misma explicación es válida para *Cryptosporidium* spp., donde la detección (e identificación a nivel de especie) inicial del parásito fue llevada a cabo mediante *ssu* rARN-PCR y el genotipado (para las especies confirmadas como *C. hominis*, *C. parvum* y *C. viatorum*) mediante la amplificación del gen de copia única *gp60*. Las bajas cargas parasitarias inferidas de estos datos correlacionarían bien con infecciones ligeras por *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. no asociadas a manifestaciones clínicas en los niños afectados.

En este estudio *E. bienewsi* ha sido la única especie de microsporidio investigada. Esta decisión fue basada en la evidencia previa disponible mostrando que *E. bienewsi* es la especie de mayor relevancia clínica, principalmente en pacientes inmunodeficientes (ver secciones 1.1.3. y 1.10.3.). Sin embargo, un estudio llevado a cabo en población general aparentemente sana en la República Checa ha demostrado que especies del género *Encephalitozoon* como *E. hellem* y *E. cuniculi* son más prevalentes que *E. bienewsi* en individuos asintomáticos (Sak et al., 2011). Este hallazgo indica claramente la conveniencia de reevaluar las muestras analizadas en este estudio para determinar la posible presencia de *Encephalitozoon* spp. Esta es una tarea pendiente que será acometida por el LRIP próximamente. La misma consideración debe ser hecha para otras especies de protozoos, como *D. fragilis*, que no han sido abordados en este trabajo.

### Directrices futuras

Uno de los hallazgos más destacables de este trabajo ha sido la elevada prevalencia de protistas entéricos demostrada en niños asintomáticos tanto en España como en Mozambique. Tomando como punto de partida este hecho, una de las preguntas inmediatas es: ¿por qué las infecciones por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. o *E. bienewsi* cursan con diarrea aguda en unos casos, pero es subclínica en otros? Entre los factores determinantes del curso de la infección (ver sección 1.2.), la interacción con otros agentes patógenos (coinfeción) y con la microbiota del hospedador en la interfase lumen/mucosa intestinal es una hipótesis atractiva que ha cobrado especial

relevancia en los últimos años. La información actualmente disponible en esta área de investigación, aunque aún escasa, es particularmente interesante (pero no limitada a) para *G. duodenalis*. En un trabajo realizado en Israel, *G. duodenalis* (pero no *Cryptosporidium* spp.) era capaz de modular la gravedad de la infección por rotavirus: los episodios de diarrea causados por rotavirus en infección única eran significativamente más graves que los causados en coinfección con *G. duodenalis* (Bilenko *et al.*, 2004). Este efecto “protector” de *G. duodenalis* también ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo en el LRIP en reservorios animales. Así, los parásitos extracelulares *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp., pero no los intracelulares *Cryptosporidium* spp. y *E. bienersi*, modulaban la tasa de infección por el virus de la hepatitis E (o viceversa) en cerdos ibéricos y jabalíes de vida libre (Dashti *et al.*, 2020; Rivero-Juarez *et al.*, 2020). Los mecanismos moleculares causantes de este efecto no están bien establecidos, pero es altamente probable que en la definición del curso de la infección también intervenga el resultado de la competición directa entre los diferentes patógenos presentes en el tracto intestinal del hospedador a través de barreras físicas (p.e. permeabilidad intestinal) o bioquímicas (p.e. inmunomodulación). Varias líneas de evidencia científica apoyarían ambas posibilidades. En primer lugar, se ha sugerido que *G. duodenalis* atenuaba la colitis causada por *Escherichia coli* mediante la expresión de péptidos antimicrobianos por parte del hospedador tras la estimulación de las células del epitelio intestinal con cisteína proteasas similares a la catepsina B liberadas por el parásito (Manko *et al.*, 2017). En segundo lugar, la infección por *G. duodenalis* es capaz de modular la respuesta proinflamatoria del hospedador a bacterias patógenas. Por ejemplo, la presencia del parásito reducía la infiltración de granulocitos y la inflamación del tejido intestinal en un modelo *in vivo* de colitis inducida por toxinas de *Clostridium difficile* (Cotton *et al.*, 2014b). En tercer lugar, la liberación por parte de *G. duodenalis* de catepsina B atenuaba la secreción de interleucina-8 (un potente factor quimiotáctico de neutrófilos) en la mucosa intestinal activada tras la administración de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Cotton *et al.*, 2014a). En cuarto y último lugar, *G. duodenalis* inhibe la producción de óxido nítrico en el epitelio intestinal (uno de los mecanismos defensivos del hospedador contra infecciones por enteropatógenos) mediante el consumo de arginina, esencial para la generación del compuesto (Eckmann *et al.*, 2000).

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS) basadas en la amplificación de los marcadores *ssu* rARN 16S (procariotas) y 18S (eucariotas) han demostrado ser herramientas potentes y particularmente versátiles para inferir la composición, frecuencia relativa y potenciales interacciones en la comunidad microbiana (incluidos patógenos exógenos)

presentes en el tracto intestinal, así como su posible implicación en patogenicidad. De hecho, la virulencia microbiana ha sido recientemente considerada como una propiedad emergente que implica que la consecuencia de la interacción patógeno-hospedador es inherentemente impredecible (Casadevall *et al.*, 2011). Diferentes estudios han demostrado que la microbiota intestinal desempeña un papel decisivo en el control tanto de infecciones causadas por patógenos invasores como de microorganismos habitualmente comensales que bajo determinadas circunstancias pueden actuar como patógenos (patobiontes). Entre los mecanismos propuestos para tal fin destacan las interacciones competitivas por nutrientes y metabolitos esenciales o por la explotación de nichos ecológicos específicos en el intestino, o la capacidad de modulación de la respuesta inmune del hospedador (Cerf-Bensussan y Gaboriau-Routhiau, 2010; Kamada *et al.*, 2013). Así, la presencia de *Blastocystis* sp. ha sido directamente asociada con disbiosis en ausencia de enfermedad o inflamación del tracto gastrointestinal (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Por otra parte, la comunidad bacteriana intestinal de ratones experimentalmente infectados con *C. parvum* difería substancialmente de la de ratones no infectados (Ras *et al.*, 2015). Además, *G. duodenalis* era capaz de alterar la composición de biofilms y comunidades microbianas provenientes de biopsias intestinales humanas en cultivos celulares *in vitro* y en un modelo murino con animales libres de gérmenes (Beatty *et al.*, 2017). Por último, el incremento tanto de *Prevotella copri* como de *E. histolytica* ha sido asociado con diarrea en niños menores de 2 años en Bangladesh (Gilchrist *et al.*, 2016). La infección por este mismo patógeno ha sido también asociada a una disminución en la abundancia de *Clostridia*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Campylobacter* y *Eubacterium*, pero a un incremento de *Bifidobacterium* comparado con controles sanos (Burgess y Petri, 2016). En base a todo lo expuesto, y en línea con la hipótesis planteada por Bartelt y Platts-Mills (2016), este trabajo de tesis doctoral proporciona evidencia epidemiológica y molecular en favor de la consideración de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Blastocystis* sp. y *E. bienersi* (y, por extensión, posiblemente de otras especies de protistas enteroparásitos) como patobiontes.





## **6. CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

1. La infección/colonización por protistas entéricos era frecuente en niños aparentemente sanos tanto en Leganés (España) como en Zambézia (Mozambique). La población pediátrica investigada en Zambézia presentaba tasas de parasitación/colonización por al menos una especie de protista, de infecciones mixtas y de infección por *Giardia duodenalis* significativamente superiores que su homónima en Leganés, sugiriendo un escenario epidemiológico de alta prevalencia parasitaria.
2. Las prevalencias de *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp. y *Enterocytozoon bieneusi* halladas en las dos poblaciones pediátricas investigadas eran muy similares, a pesar de las diferencias higiénico-sanitarias y de infraestructuras de agua potable y saneamiento entre España y Mozambique.
3. En Leganés, la transmisión de protistas entéricos era principalmente por contacto directo persona-persona en microfocos locales de naturaleza oportunista bajo condiciones ambientales favorables. No se demostraron factores de riesgo asociados. En Zambézia, existían vías de transmisión alternativas de origen hídrico, alimentario y zoonótico animal-persona indicativas de una elevada contaminación ambiental. Esta situación estaba estrechamente ligada a las deficientes infraestructuras de agua potable y saneamiento, y por lo tanto a las condiciones de pobreza y falta de recursos, de esta región de Mozambique.
4. La diversidad molecular de los protistas entéricos (tanto en especies como en variantes genéticas) investigados era muy superior en los niños de Zambézia que en los niños de Leganés. Este hecho estaría en consonancia con las elevadas tasas de infección y reinfección descritas en Mozambique.
5. No se hallaron diferencias observables en la distribución de especies/genotipos de los protistas objeto de estudio en las poblaciones de niños sintomáticos y asintomáticos analizadas tanto en Leganés como en Zambézia, sugiriendo que la variante genética del protista considerado no es esencial para desencadenar la transición entre infección y enfermedad.
6. Los animales domésticos constituían una fuente significativa de infecciones humanas por protistas entéricos (confirmadas molecularmente para *Cryptosporidium felis*,

sospechadas para *G. duodenalis* y *Blastocystis* sp.) en Zambézia, pero no en Leganés. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de estudiar muestras de origen animal y medioambiental, esenciales para identificar fuentes de infección y vías de transmisión.

7. Los datos epidemiológicos y moleculares obtenidos apoyan la propuesta de considerar, en menor o mayor medida, a *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba dispar*, *Blastocystis* sp. y *Enterocytozoon bieneusi* como organismos patobiontes.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**





## 7. Bibliografía

- Abal-Fabeiro JL, Maside X, Llovo J, Bartolomé C. Aetiology and epidemiology of human cryptosporidiosis cases in Galicia (NW Spain), 2000–2008. *Epidemiol Infect.* 2015;143:3022–3035.
- Abal-Fabeiro JL, Maside X, Llovo J, Bello X, Torres M, Treviño M, Moldes L, Muñoz A, Carracedo A, Bartolomé C. High-throughput genotyping assay for the large-scale genetic characterization of *Cryptosporidium* parasites from human and bovine samples. *Parasitology.* 2014;141:491–500.
- Abda IB, Essid R, Mellouli F, Aoun K, Bejaoui M, Bouratbine A. *Cryptosporidium* infection in patients with major histocompatibility complex class II deficiency syndrome in Tunisia: description of five cases. *Arch Pediatr.* 2011;18:939–944.
- Abd-Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health.* 2002;7:365–370.
- Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res.* 2011;109:321–327.
- Abdel-Magied AA, Elahwel AM. Factors associated with intestinal parasitic infection among school children in Sirt, Libya. *Benha Med J.* 2006;23:821–832.
- Abdelmalek R, Anane S, Chabchoub N, Essid R, Aoun K, Chaabéne TB, Bouratbine A. Microsporidia and cryptosporidia coinfection in an HIV-infected newborn. *Arch Pediatr.* 2011;18:562–564.
- Abdel-Moein KA, Saeed H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. *Parasitol Res.* 2016;115:3197–3202.
- Abreu-Acosta N, Lorenzo-Morales J, Leal-Guio Y, Coronado-Álvarez N, Foronda P, Alcoba-Florez J, Izquierdo F, Batista-Díaz N, Del Aguila C, Valladares B. *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99:848–855.
- Abu Samra N, Thompson PN, Jori F, Frean J, Poonsamy B, du Plessis D, Mogoye B, Xiao L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrhoeic children from four provinces in South Africa. *Zoonoses Public Health.* 2013;60:154–159.
- Acácio S, Mandomando I, Nhampossa T, Quintó L, Vubil D, Sacoor C, Kotloff K, Farag T, Nasrin D, Macete E, Levine MM, Alonso P, Bassat Q. Risk factors for death among children 0-

- 59 months of age with moderate-to-severe diarrhea in Manhiça district, southern Mozambique. *BMC Infect Dis.* 2019;19:322.
- Adam EA, Yoder JS, Gould LH, Hlavsa MC, Gargano JW. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol Infect.* 2016;144:2790–2801.
- Adamu H, Petros B, Hailu A, Petry F. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Trop.* 2010;115:77–83.
- Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, Feng Y, Xiao L. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2831.
- Adell-Aledón M, Köster PC, de Lucio A, Puente P, Hernández-de-Mingo M, Sánchez-Thevenet P, Dea-Ayuela MA, Carmena D. Occurrence and molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in dog populations in eastern Spain. *BMC Vet Res.* 2018;14:26.
- Adler S, Widerström M, Lindh J, Lilja M. Symptoms and risk factors of *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak in Sweden. *Parasitol Res.* 2017;116:2613–618.
- Agencia Estatal de Meteorología. Informe Anual 2018. Disponible en [www.aemet.es](http://www.aemet.es)
- Agnew DG, Lima AA, Newman RD, Wuhib T, Moore RD, Guerrant RL, Sears CL. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. *J Infect Dis.* 1998;177:754–760.
- Aissa S, Chabchoub N, Abdelmalek R, Kanoun F, Goubantini A, Ammari L, Kilani B, Bouratbine A, Tiouiri-Ben Aissa H, Aoun K. Asymptomatic intestinal carriage of microsporidia in HIV-positive patients in Tunisia: prevalence, species, and pathogenesis. *Med Sante Trop.* 2017;27:281–285.
- Ajjampur SSR, Koshy B, Venkataramani M, Sarkar R, Joseph AA, Jacob KS, Ward H, Kang G. Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India. *Ann Trop Paediatr.* 2011;31:205–212.
- Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Adamu H, Xiao L. Unusual *Enterocytozoon bienersi* genotypes and *Cryptosporidium hominis* subtypes in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:157–161.
- Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Dearen T, Leon ET, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in HIV-infected persons in Benin City, Edo State, Nigeria. *Fooyin J Health Sci.* 2010;2:85–89.

- Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Dearen T, Leon ET, Xiao L. Molecular epidemiologic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:441–445.
- Akiyoshi DE, Tumwine JK, Bakeera-Kitaka S, Tzipori S. Subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda. *J Parasitol.* 2006;92:1097–1100.
- Akiyoshi DE, Weiss LM, Feng X, Williams BA, Keeling PJ, Zhang Q, Tzipori S. Analysis of the beta-tubulin genes from *Enterocytozoon bieneusi* isolates from a human and rhesus macaque. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54:38–41.
- Alexander KA, Herbein, J, Zajac, A. The occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections among patients reporting diarrheal disease in Chobe District, Botswana. *Adv Infect Dis.* 2012;2:143–147.
- Alexieff A. Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *C R Soc Biol.* 1911;71:296–298.
- Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, Doumbo O, Desportes-Livage I, Thera MA, Danis M, Datry A. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Microbiol.* 2002;40:1715–1718.
- Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013a;126:11–18.
- Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 2013b;164:497–509.
- Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol.* 2008;8:698–707.
- Almeria S, Cinar HN, Dubey JP. *Cyclospora cayetanensis* and cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms.* 2019;7:pii: E317.
- Alonso-Sanz M, Chaves F, Drona F, Catalán S, González-López A. Intestinal parasitoses in the prison population in the Madrid area (1991-1993). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:90–95.
- Amorós I, Alonso JL, Cuesta G. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J Food Prot.* 2010;73:1138–1140.

- Anane S, Kaouech E, Belhadj S, Abdelmalek R, Ammari L, Ben Othman T, Bejaoui M, Ben Chaabane T, Kallel K, Chaker E. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* by PCR in stools of Tunisian immunocompromised patients. *Pathol Biol*. 2011;59:234–239.
- Andersen LO, Stensvold CR. *Blastocystis* in health and disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective? *J Clin Microbiol*. 2016;54:524–528.
- Andersson JO. Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends Parasitol*. 2012;28:46–52.
- Angal L, Mahmud R, Samin S, Yap NJ, Ngui R, Amir A, Ithoi I, Kamarulzaman A, Lim YA. Determining intestinal parasitic infections (IPIs) in inmates from Kajang Prison, Selangor, Malaysia for improved prison management. *BMC Infect Dis*. 2015;15:467.
- Anim-Baidoo I, Narh CA, Oddei D, Brown CA, Enweronu-Laryea C, Bando B, Sampane-Donkor E, Armah G, Adjei AA, Adjei DN, Ayeh-Kumi PF, Gyan BA. *Giardia lamblia* infections in children in Ghana. *Pan Afr Med J*. 2016;24:217.
- Ankarklev J, Hestvik E, Lebbad M, Lindh J, Kaddu-Mulindwa DH, Andersson JO, Tylleskär T, Tumwine JK, Svärd SG. Common coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in non-symptomatic Ugandan children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012a;6:e1780.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:413–22.
- Ankarklev J, Svärd SG, Lebbad M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. *BMC Microbiol*. 2012b;12:65.
- Appelbee AJ, Thompson RC, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends Parasitol*. 2005;21:370-376.
- Areeshi M, Dove W, Papaventsis D, Gatei W, Combe P, Grosjean P, Leatherbarrow H, Hart CA. *Cryptosporidium* species causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102:309–315.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J Eukaryot Microbiol*. 2002;49:42–53.
- Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018;391:1608–1621.
- Ashford RW, Atkinson EA. Epidemiology of *Blastocystis hominis* infection in Papua New Guinea: age-prevalence and associations with other parasites. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992;86:129–136.

- Augusto G, Nalá R, Casmo V, Sabonete A, Mapaco L, Monteiro J. Geographic distribution and prevalence of schistosomiasis and soil-transmitted helminths among schoolchildren in Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:799–803.
- Autier B, Belaz S, Razakandrainibe R, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa. *Parasite.* 2018;25:48.
- Ayele BH, Geleto A, Ayana DA, Redi M. Prevalence of feco-oral transmitted protozoan infections and associated factors among university students in Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2019;19:499.
- Ayinmode AB, Fagbemi BO, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in children in Oyo State, Nigeria: implications for infection sources. *Parasitol Res.* 2012;110:479–481.
- Ayinmode AB, Ojuromi OT, Xiao L. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolates from Nigerian children. *J Parasitol Res.* 2011;2011:129542.
- Ayinmode AB, Zhang H, Dada-Adegbola HO, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* subtypes and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-infected persons in Ibadan, Nigeria. *Zoonoses Public Health.* 2014;61:297–303.
- Ayuntamiento de Leganés. Listado de colegios de educación infantil y primaria 2017. Accesible en [https://www.leganes.org/portal/contenedor\\_servicios2.jsp?seccion=s\\_p\\_208\\_final\\_cuerpo\\_educacion.jsp&language=es&codResi=1&codMenuPN=49&codMenu=59&layout=contenedor\\_servicios2.jsp&ca=4&layout=contenedor\\_servicios2.jsp](https://www.leganes.org/portal/contenedor_servicios2.jsp?seccion=s_p_208_final_cuerpo_educacion.jsp&language=es&codResi=1&codMenuPN=49&codMenu=59&layout=contenedor_servicios2.jsp&ca=4&layout=contenedor_servicios2.jsp)
- Azcona-Gutiérrez JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, García-García C, Soria-Blanco LM, Morales L, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D. Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. *PLoS One.* 2017;12:e0178575.
- Babaei Z, Malihi N, Zia-Ali N, Sharifi I, Mohammadi MA, Kagnoff MF, Eckmann L, Singer SM, Solaymani-Mohammadi S. Adaptive immune response in symptomatic and asymptomatic enteric protozoal infection: evidence for a determining role of parasite genetic heterogeneity in host immunity to human giardiasis. *Microbes Infect.* 2016;18:687–695.

- Bahrami F, Babaei E, Badirzadeh A, Riabi TR, Abdoli A. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39:1027–1042.
- Baker KK, O'Reilly CE, Levine MM, Kotloff KL, Nataro JP, Ayers TL, Farag TH, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Alonso PL, Breiman RF, Omoro R, Faruque AS, Das SK, Ahmed S, Saha D, Sow SO, Sur D, Zaidi AK, Quadri F, Mintz ED. Sanitation and hygiene-specific risk factors for moderate-to-severe diarrhea in young children in the Global Enteric Multicenter Study, 2007-2011: Case-control study. *PLoS Med*. 2016;13:e1002010.
- Balbani G. Sur les microsporidies ou psorospermies des articles C R Acad Sci. 1882;95:1168–1171.
- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks-An update 2004-2010. *Water Res*. 2011;45:6603–6614.
- Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol*. 2010;26:180–189.
- Barrera JP, Carmena D, Rodríguez E, Checa R, López AM, Fidalgo LE, Gálvez R, Marino V, Fuentes I, Miró G, Montoya A. The red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential natural reservoir of human cryptosporidiosis by *Cryptosporidium hominis* in Northwest Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2020; doi: 10.1111/tbed.13569.
- Bartelt LA, Platts-Mills JA. *Giardia*: A pathogen or commensal for children in high-prevalence settings? *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29:502–507.
- Bartelt LA, Sevilleja JE, Barrett LJ, Warren CA, Guerrant RL, Bessong PO, Dillingham R, Samie A. High anti-*Cryptosporidium parvum* IgG seroprevalence in HIV-infected adults in Limpopo, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89:531–534.
- Bauhofer AFL, Cossa-Moiane I, Marques S, Guimarães EL, Munlela B, Anapakala E, Chilaúle JJ, Cassocera M, Langa JS, Chissaque A, Sambo J, Manhique-Coutinho L, Bero DM, Kellogg TA, de Deus N. Intestinal protozoan infections among children 0-168 months with diarrhea in Mozambique: June 2014 - January 2018. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14:e0008195.
- Beatty JK, Akierman SV, Motta JP, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ, Bhargava A, Beck PL, Rioux KP, McKnight GW, Wallace JL, Buret AG. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *Int J Parasitol*. 2017;47:311–326.

- Bechir M, Schelling E, Hamit MA, Tanner M, Zinsstag J. Parasitic infections, anemia and malnutrition among rural settled and mobile pastoralist mothers and their children in Chad. *Ecohealth*. 2012;9:122–31.
- Beck DL, Doğan N, Maro V, Sam NE, Shao J, Houpt ER. High prevalence of *Entamoeba moshkovskii* in a Tanzanian HIV population. *Acta Trop*. 2008;107:48–49.
- Becker SL, Chatigre JK, Gohou J-P, Coulibaly JT, Leuppi R, Polman K, Chappuis F, Mertens P, Herrmann M, N'Goran EK, Utzinger J, von Müller L. Combined stool-based multiplex PCR and microscopy for enhanced pathogen detection in patients with persistent diarrhoea and asymptomatic controls from Côte d'Ivoire. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:591.e1-10.
- Belda Rustarazo S, Morales Suárez-Varela M, Gracia Antequera M, Esteban Sanchis JG. Enteroparasitosis en población escolar de Valencia. *Aten Primaria*. 2008;40:641–2.
- Ben Abda I, Maatoug N, Ben Romdhane R, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K, Viscogliosi E, Bouratbine A. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* sp. in healthy individuals in the Tunis area, Tunisia. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96:202–204.
- Ben Ayed L, Yang W, Widmer G, Cama V, Ortega Y, Xiao L. Survey and genetic characterization of wastewater in Tunisia for *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Cyclospora cayetanensis* and *Eimeria* spp. *J Water Health*. 2012;10:431–444.
- Benito M, Menacho C, Chueca P, Ormad MP, Goñi P. Seeking the reuse of effluents and sludge from conventional wastewater treatment plants: Analysis of the presence of intestinal protozoa and nematode eggs. *J Environ Manage*. 2020;261:110268.
- Benouis A, Bekkouche Z, Benmansour Z. Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria). *Int J Innov Appl Stud*. 2013;2:613–620.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*. 2002;59:564–571.
- Berrilli F, D'Alfonso R, Giangaspero A, Marangi M, Brandonisio O, Kaboré Y, Glé C, Cianfanelli C, Lauro R, Di Cave D. *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Côte d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106:191–195.
- Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol*. 2004;126:219–234.

- Bhutta ZA, Das JK, Walker N, Rizvi A, Campbell H, Rudan I, Black RE. Lancet Diarrhoea and Pneumonia Interventions Study Group Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhoea equitably: What works and at what cost? *Lancet*. 2013;381:1417–1429.
- Bilenko N, Levy A, Dagan R, Deckelbaum RJ, El-On Y, Fraser D. Does co-infection with *Giardia lamblia* modulate the clinical characteristics of enteric infections in young children? *Eur J Epidemiol*. 2004;19:877–883.
- Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3723-3728.
- Blackburn BG, Mazurek JM, Hlavsa M, Park J, Tillapaw M, Parrish M, Salehi E, Franks W, Koch E, Smith F, Xiao L, Arrowood M, Hill V, da Silva A, Johnston S, Jones JL. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:684–686.
- Blake DP, Betson M. One Health: parasites and beyond. *Parasitology*. 2017;144:1–6.
- Blanco MA, de Lucio A, Fuentes I, Carmena D. *Cryptosporidium ubiquitum* in Venezuela: First report in a paediatric patient with acute diarrhoea. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:142–143.
- Blanco MA, Montoya A, Iborra A, Fuentes I. Identification of *Cryptosporidium* subtype isolates from HIV-seropositive patients in Equatorial Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108:594–596.
- Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, Tannich E. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4745–4750.
- Boaitey YA, Nkrumah B, Idriss A, Tay SCK. Gastrointestinal and urinary tract pathogenic infections among HIV seropositive patients at the Komfo Anokye Teaching Hospital in Ghana. *BMC Res Notes*. 2012;5:454.
- Bodager JR, Parsons MB, Wright PC, Rasambainarivo F, Roellig D, Xiao L, Gillespie TR. Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar. *Vet Parasitol*. 2015;207:140–143.
- Bolka A, Gebremedhin S. Prevalence of intestinal parasitic infection and its association with anemia among pregnant women in Wondo Genet district, Southern Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2019;19:483.

- Bouyou-Akotet MK, Owono-Medang M, Moussavou-Boussougou MN, Mamfoumbi MM, Mintsá-Nguema R, Mawili-Mboumba DP, Kombila M. Low sensitivity of the ImmunocardSTAT® Crypto/Giardia Rapid Assay test for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal samples from children living in Libreville, Central Africa. *J Parasit Dis.* 2016;40:1179–1183.
- Bouzig M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:115–134.
- Bretagne S, Foulet F, Alkassoum W, Fleury-Feith J, Develoux M. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* spores in the stool of AIDS patients and African children not infected by HIV. *Bull Soc Pathol Exot.* 1993;86:351–357.
- Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, Nzamba C, Kombila M, Accoceberry I, Thellier M. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2580–2589.
- Breurec S, Vanel N, Bata P, Chartier L, Farra A, Favennec L, Franck T, Giles-Vernick T, Gody J-C, Nguyen LBL, Onambélé M, Rafai C, Razakandrainibe R, Tondeur L, Tricou V, Sansonetti P, Vray M. Etiology and epidemiology of diarrhea in hospitalized children from low income country: A matched case-control study in Central African Republic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004283.
- Brink AK, Mahé C, Watera C, Lugada E, Gilks C, Whitworth J, French N. Diarrhea, CD4 counts and enteric infections in a community-based cohort of HIV-infected adults in Uganda. *J Infect.* 2002;45:99–106.
- Brumpt E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. *Bull Soc Pathol Exot.* 1912;5:725–730.
- Brumpt E. Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe à kystes quadri-nucléés, parasite de l'homme. *Bull Acad Med (Paris).* 1925;94:943–952.
- Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:2595–2599.
- Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 2007;56:316–317.
- Burgess SL, Petri WA. The intestinal bacterial microbiome and *E. histolytica* infection. *Curr Trop Med Rep.* 2016;3:71–74.

- Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2017;390:2397–2409.
- Butera E, Mukabutera A, Nsereko E, Munyanshongore C, Rujeni N, Mwikarago IE, Moreland PJ, Manasse MN. Prevalence and risk factors of intestinal parasites among children under two years of age in a rural area of Rutsiro district, Rwanda - a cross-sectional study. *Pan Afr Med J*. 2019;32:11.
- Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:471–480.
- Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*. 2010;124:107–112.
- Calero-Bernal R, Carmena D. *Giardia*. En Liu D (Ed.), *Handbook of Foodborne Diseases*. Boca Ratón, CA, EEUU: Taylor and Francis CRC Press; 2018:621–632.
- Calero-Bernal R, Santín M, Maloney JG, Martín-Pérez M, Habela MA, Fernández-García JL, Figueiredo A, Nájera F, Palacios MJ, Mateo M, Balseiro A, Barral M, Lima-Barberoi JF, Köster PC, Carmena D. *Blastocystis* sp. subtype diversity in wild carnivore species from Spain. *J Eukaryot Microbiol*. 2020;67:273–278.
- Cama VA, Mathison BA. Infections by intestinal Coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clin Lab Med*. 2015;35:423–444.
- Cano L, de Lucio A, Bailo B, Cardona GA, Muadica AS, Lobo L, Carmena D. Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Northern Spain. *Vet Parasitol*. 2016;221:144–148.
- Cardona GA, Carabin H, Goñi P, Arriola L, Robinson G, Fernández-Crespo JC, Clavel A, Chalmers RM, Carmena D. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ*. 2011;412–413:101–108.
- Carmena D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. En Mendez-Vilas A (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz, Spain: Formatex; 2010:3–14.
- Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol*. 2007;102:619–629.

- Carmena D, Cardona GA, Sánchez-Serrano LP. Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. *World J Clin Infect Dis*. 2012;2:1–12.
- Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LMD, Salmazo CAA, Bóia MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007;49:147–153.
- Carville A, Mansfield K, Widmer G, Lackner A, Kotler D, Wiest P, Tzipori S. Development and application of genetic probes for detection of *Enterocytozoon bieneusi* in formalin-fixed stools and in intestinal biopsy specimens from infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4:405–408.
- Casadevall A, Fang FC, Pirofski LA. Microbial virulence as an emergent property: Consequences and opportunities. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002136.
- Casemore DP, Jackson FP. Hypothesis: cryptosporidiosis in human beings is not primarily a zoonosis. *J Infect*. 1984;9:153–156.
- Casmo V, Lebbad M, Maungate S, Lindh J. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* among adult patients with diarrhoea in Maputo, Mozambique. *Heliyon*. 2018;4:e00769.
- Castro-Hermida JA, García-Preledo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ*. 2008;405:45–53.
- Castro-Hermida JA, García-Preledo I, Almeida A, González-Warleta M, Da Costa JM, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Res*. 2009;43:4133–4142.
- Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218:132–138.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*. 1998;73:203–266.
- Cavalier-Smith T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Louksozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:1741–1758.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci*. 2004;271:1251–1262.

- Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur J Protistol.* 2014;50:472–495.
- Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, Madden JF, Gaido L, Schwartz DA, Manji K, Jorgensen AF, Miller SE, Pulipaka UP, Msengi AE, Mwakyusa DH, Sterling CR, Reller LB. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin Infect Dis.* 1999;28:314–321.
- Centeno-Lima S, Rosado-Marques V, Ferreira F, Rodrigues R, Indequé B, Camará I, De Sousa B, Aguiar P, Nunes B, Ferrinho P. *Giardia duodenalis* and chronic malnutrition in children under five from a rural area of Guinea-Bissau. *Acta Med Port.* 2013;26:721–724.
- Central Intelligence Agency. Mozambique-The World Factbook, 2015. Disponible en [www.cia.gov](http://www.cia.gov)
- Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades. Giardiasis - Annual 454 Epidemiological Report for 2015. Stockholm: ECDC; 2018a.
- Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades. Cryptosporidiosis - 450 Annual Epidemiological Report for 2015. Stockholm: ECDC; 2018b.
- Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2015. Madrid, 2017.
- Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2016. Madrid, 2018.
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat Rev Immunol.* 2010;10:735–744.
- Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2017;33:561–576.
- Cerveja BZ, Tucuzo RM, Madureira AC, Nhacupe N, Langa IA, Buene T, Banze L, Funzamo C, Noormahomed EV. Prevalence of intestinal parasites among HIV infected and HIV uninfected patients treated at the 1° De Maio Health Centre in Maputo, Mozambique. *EC Microbiol.* 2017;9:231–240.
- Chabchoub N, Abdelmalek R, Breton J, Kanoun F, Thellier M, Bouratbine A, Aoun K. Genotype identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolates from stool samples of HIV-infected Tunisian patients. *Parasite* 2012a;19:147–151.

- Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, Kanoun F, Ben Chaabene T, Bouratbine A, Aoun K. Apport de la PCR dans la recherche et l'identification des microsporidies intestinales chez les sujets infectés par le VIH. *Pathol Biol.* 2012b;60:91–94.
- Chabchoub N, Abdelmalek R, Mellouli F, Kanoun F, Thellier M, Bouratbine A, Aoun K. Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:24–27.
- Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveill.* 2009;14:19086.
- Champion L, Durrbach A, Lang P, Delahousse M, Chauvet C, Sarfati C, Glotz D, Molina JM. Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2010;10:1925–1930.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:851–857.
- Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, DuPont HL. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis.* 1996;73:232–236.
- Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Ríos A, González-Lázaro M, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: fibrillar aggregates in dividing trophozoites. *Exp Parasitol.* 2008;118:280–284.
- Checkley W, White AC Jr, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, Fayer R, Griffiths JK, Guerrant RJ, Hedstrom L, Huston CD, Kotloff KL, Kang G, Mead JR, Miller M, Petri Jr WA, Priest JW, Roos DS, Striepen B, Thompson RCA, Ward HD, Van Voorhis WA, Xiao L, Zhu G, Houpt ER. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:85–94.
- Chen KT, Chen CJ, Chiu JP. A school waterborne outbreak involving both *Shigella sonnei* and *Entamoeba histolytica*. *J Environ Health.* 2001;64:9–13.
- Chen YW, Zheng WB, Zhang NZ, Gui BZ, Lv QY, Yan JQ, Zhao Q, Liu GH. Identification of *Cryptosporidium viatorum* XVa subtype family in two wild rat species in China. *Parasit Vectors.* 2019;12:502.

- Chopra M, Mason E, Borrazzo J, Campbell H, Rudan I, Liu L, Zulfiqar RE, Bhutta A. Ending of preventable deaths from pneumonia and diarrhoea: An achievable goal. *Lancet*. 2013;381:1499–1506.
- Choy SH, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MA, Nasr NN, Sulaiman M, Lim YA, Surin J. Prevalence and associated risk factors of *Giardia* infection among indigenous communities in rural Malaysia. *Sci Rep*. 2014;4:6909.
- Christy NC, Petri WA Jr. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol*. 2011;6:1501–1519.
- Cieloszyk J, Goñi P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:549–551.
- Cifre S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Merino JF, Trelis M. *Blastocystis* subtypes and their association with irritable bowel syndrome. *Med Hypotheses*. 2018;116:4–9.
- Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol*. 1993;77:450–455.
- Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. *Curr Protoc Microbiol*. 2016;43:20A.1.1-20A.1.8.
- Clavel A, Arnal AC, Sánchez EC, Cuesta J, Letona S, Amiguet JA, Castillo FJ, Varea M, Gómez-Lus R. Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection*. 1996a;24:341–346.
- Clavel A, Arnal AC, Sánchez EC, Varea M, Castillo FJ, Ramírez de Ocariz I, Quílez J, Cuesta J. Evaluation of the optimal number of faecal specimens in the diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14:46–49.
- Clavel A, Olivares JL, Fleta J, Castillo J, Varea M, Ramos FJ, Arnal AC, Quílez J. Seasonality of cryptosporidiosis in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996b;15:77–79.
- Cobo F, Salas-Coronas J, Cabezas-Fernández MT, Vázquez-Villegas J, Cabeza-Barrera MI, Soriano-Pérez MJ. Infectious diseases in immigrant population related to the time of residence in Spain. *J Immigr Minor Health*. 2016;18:8–15.
- Colli CM, Mizutani AS, Martins VA, Ferreira EC, Gomes ML. Prevalence and risk factors for intestinal parasites in food handlers, southern Brazil. *Int J Environ Health Res*. 2014;24:450–458.

- Comisión Europea. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. The Drinking Water Directive, European Commission. 1998. Disponible en [https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation\\_en.html](https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation_en.html)
- Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol*. 2007;17:1984–1988.
- Cooper MA, Sterling CR, Gilman RH, Cama V, Ortega Y, Adam RD. Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. *J. Infect. Dis.*, 2010;202:1713–1721.
- Cornick S, Chadee K. *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*. 2017;5:e1283386.
- Corso P, Kramer M, Blair K, Addiss D, Davis J, Haddix A. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:426–431.
- Costa SF, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resist Updat*. 2000;3:384–399.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol*. 2011;41:925–933.
- Cotton JA, Bhargava A, Ferraz JG, Yates RM, Beck PL, Buret AG. *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect Immun*. 2014a;82:2772–2787.
- Cotton JA, Motta JP, Schenck LP, Hirota SA, Beck PL, Buret AG. *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*. 2014b;9:e109087.
- Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clin Infect Dis*. 2012;54:105–110.
- Creek TL, Kim A, Lu L, Bowen A, Masunge J, Arvelo W, Smit M, Mach O, Legwaila K, Motswere C, Zaks L, Finkbeiner T, Povinelli L, Maruping M, Ngwaru G, Tebele G, Bopp C, Puhr N, Johnston SP, Dasilva AJ, Bern C, Beard RS, Davis MK. Hospitalization and mortality among primarily nonbreastfed children during a large outbreak of diarrhea and malnutrition in Botswana, 2006. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53:14–19.
- Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infect Genet Evol*. 2019;75:104018.
- Dacal E, Köster PC, Carmena D. 2020. Molecular diagnosis of intestinal parasitoses. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 38(Supl 1):24–31.

- Dacal E, Saugar JM, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Robinson E, Köster PC, Aznar-Ruiz-de-Alegría ML, Espasa M, Ninda A, Gandasegui J, Sulleiro E, Moreno M, Salvador F, Molina I, Rodríguez E, Carmena D. Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasit Vectors*. 2018;11:67.
- D'Alfonso R, Santoro M, Essi D, Monsia A, Kaboré Y, Glé C, Di Cave D, Sorge RP, Di Cristanziano V, Berrilli F. *Blastocystis* in Côte d'Ivoire: molecular identification and epidemiological data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:2243–2250.
- Das K, Ganguly S. Evolutionary genomics and population structure of *Entamoeba histolytica*. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014;12:26–33.
- Dashti A, Rivero-Juarez A, Santín M, López-López P, Caballero-Gómez J, Frías-Casas M, Köster PC, Bailo B, Calero-Bernal R, Briz V, Carmena D. *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia): identification of novel genotypes and evidence of transmission between sympatric wild boars (*Sus scrofa ferus*) and Iberian pigs (*Sus scrofa domesticus*) in Southern Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2020; doi: 10.1111/tbed.13658.
- Dashti A, Santín M, Cano L, de Lucio A, Bailo B, de Mingo MH, Köster PC, Fernández-Basterra JA, Aramburu-Aguirre J, López-Molina N, Fernández-Crespo JC, Calero-Bernal R, Carmena D. Occurrence and genetic diversity of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in owned and sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Parasitol Res*. 2019;118:2979–2987.
- Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatric Infect Dis J*. 2009;28:838–840.
- Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, Gustavsson AM, Löfdahl M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect*. 2012;140:519–527.
- de Glanville WA, Thomas LF, Cook EAJ, Bronsvoort BMC, Wardrop N, Wamae CN, Kariuki S, Fèvre EM. General contextual effects on neglected tropical disease risk in rural Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0007016.
- de Lucio A, Amor-Aramendía A, Bailo B, Saugar JM, Anegagrie M, Arroyo A, López-Quintana B, Zewdie D, Ayehubizu Z, Yizengaw E, Abera B, Yimer M, Mulu W, Hailu T, Herrador Z, Fuentes I, Carmena D. 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*. 2016a;11:e0159992.

- de Lucio A, Bailo B, Aguilera M, Cardona GA, Fernández-Crespo JC, Carmena D. 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 Trop.* 2017;170:48–56.
- de Lucio A, Martínez-Ruiz R, Merino FJ, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PLoS One.* 2015;10:e0143981.
- de Lucio A, Merino FJ, Martínez-Ruiz R, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D. Molecular genotyping and sub-genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *Infect Genet Evol.* 2016b;37:49–56.
- Del Águila C, Navajas R, Gurbindo D, Ramos JT, Mellado MJ, Fenoy S, Muñoz Fernandez MA, Subirats M, Ruiz J, Pieniazek NJ. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44:84S–85S.
- Deplazes P, Mathis A, Weber R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib. Microbiol.* 2000;6:236–260.
- Desai NT, Sarkar R, Kang G. Cryptosporidiosis: An under-recognized public health problem. *Trop Parasitol.* 2012;2:91–98.
- Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool.* 1985;32:250–254.
- Devleeschauwer B, Bouwknegt M, Dorny P, Gabriël S, Havelaar AH, Quoilin S, Robertson LJ, Speybroeck N, Torgerson PR, van der Giessen JWB, Trevisan C. Risk ranking of foodborne parasites: State of the art. *Food Waterborne Parasitol.* 2017;8–9:1–13.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* 1993;40:340–344.
- Di Cristanziano V, Santoro M, Parisi F, Albonico M, Shaali MA, Di Cave D, Berrilli F. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* by sequence analysis in humans and animals in Pemba Island, Tanzania. *Parasitol Int.* 2014;63:438–441.
- Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 2005;94:61–76.

- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect.* 2000;2:709–720.
- Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol.* 2004;126:145–166.
- Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:485–492.
- Di Genova BM, Tonelli RR. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Front Microbiol.* 2016;7:256.
- Diongue K, Ndiaye M, Seck MC, Diallo MA, Ndiaye YD, Badiane AS, Ndiaye D. Diseases due to intestinale protozoa diagnosed at Le Dantec University Hospital in Dakar, Senegal, from 2011 to 2015. *Med Sante Trop.* 2017;27:431–434.
- Dobell C. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med.* 1920;13(Sect Hist Med):1–15.
- Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, Leo BM, Schroeder JW, Mann BJ. Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAclectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology.* 1997;46:225–235.
- Dogruman-Al F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, Hananel A, Levi L, Kopelowitz J, Babai O, Gross S, Greenberg Z, Herschkovitz Y, Mumcuoglu I. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitol Res.* 2015;114:495–500.
- Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui JM, Silva EF, Tsutsumi V, Shibayama M. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol.* 2012;11:107–117.
- Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res.* 2009;105:949–955.
- Donowitz JR, Alam M, Kabir M, Ma JZ, Nazib F, Platts-Mills JA, Bartelt LA, Haque R, Petri Jr WA. A prospective longitudinal cohort to investigate the effects of early life giardiasis on growth and all cause diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2016;63:792–797.
- dos Muchangos A. Moçambique: paisagens e regiões naturais. Tipografia Globo Lda. 1999; 01048/FBM/93.
- Dumètre A, Aubert D, Puech PH, Hohweyer J, Azas N, Villena I. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:905–912.

- Duplessis CA, Gutierrez RL, Porter CK. Review: chronic and persistent diarrhea with a focus in the returning traveler. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2017;3:9.
- DuPont HL. *Giardia*: both a harmless commensal and a devastating pathogen. *J Clin Invest* 2013;123:2352–2354.
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New Engl J Med*. 1995;332:855–859.
- Easton AV, Oliveira RG, O'Connell EM, Kepha S, Mwandawiro CS, Njenga SM, Kihara JH, Mwatele C, Odiere MR, Brooker SJ, Webster JP, Anderson RM, Nutman TB. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming. *Parasit Vectors*. 2016;9:38.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*. 2000;164:1478–1487.
- Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res*. 2017;114:14–22.
- Efunshile MA, Ngwu BA, Kurtzhals JA, Sahar S, Konig B, Stensvold CR. Molecular detection of the carriage rate of four intestinal protozoa with real-time polymerase chain reaction: possible overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:257–262.
- Eibach D, Krumkamp R, Al-Emran HM, Sarpong N, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, Tannich E, May J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. among children in rural Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003551.
- Eida AM, Eida MM, El-Desoky A. Pathological studies of different genotypes of human *Cryptosporidium* Egyptian isolates in experimentally mice. *J Egypt Soc Parasitol*. 2009;39:975.
- Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol*. 2016;34:47–52.
- El Deeb HK, Khodeer S. *Blastocystis* spp.: frequency and subtype distribution in iron deficiency anemic versus non-anemic subjects from Egypt. *J Parasitol*. 2013;99:599–602.

- El Fatni C, Olmo F, El Fatni H, Romero D, Rosales MJ. First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite*. 2014;21:48.
- El Guamri Y, Belghyti D, Achicha A, Tiabi M, Aujjar N, Barkia A, El Kharrim K, Barkia H, El-Fellaki E, Mousahel R, Bouachra H, Lakhal A. Epidemiological retrospective survey intestinal parasitism in the Provincial Hospital Center (Kenitra, Morocco): review of 10 years (1996-2005). *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009;67:191–202.
- El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, Bellanger A-P, Botterel F, Candolfi E, Desoubeaux G, Lachaud L, Morio F, Pomares C, Rabodonirina R, Wawrzyniak I, Delbac F, Gantois N, Certad G, Delhaes L, Poirier P, Viscogliosi E. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis*. 2016;16:451.
- El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis*. 2014;14:164.
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*. 2003;33:3–28.
- El-Nahas HA, Salem DA, El-Henawy AA, El-Nimr HI, Abdel-Ghaffar HA, El-Meadawy AM. *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84:44–49.
- Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int J Parasitol*. 2012;42:675–682.
- Endeshaw T, Kebede A, Verweij JJ, Wolday D, Zewide A, Tsige K, Abraham Y, Messele T, Polderman AM, Petros B. Detection of intestinal microsporidiosis in diarrhoeal patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV-1) using PCR and Uvitex-2B stain. *Ethiop Med J*. 2005;43:97–101.
- Endeshaw T, Kebede A, Verweij JJ, Zewide A, Tsige K, Abraham Y, Wolday D, Woldemichael T, Messele T, Polderman AM, Petros B. Intestinal microsporidiosis in diarrheal patients infected with human immunodeficiency virus-1 in Addis Ababa, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis*. 2006;59:306–310.

- Englund PT, Sher A (Eds.). The biology of parasitism. A molecular and immunological approach. New York, NY, EEUU: Alan R. Liss;1988.
- Engsbro AL, Stensvold CR, Vedel Nielsen H, Bytzer P. Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in Danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Infect Dis.* 2014;46:204–209.
- Enserink R, Scholts R, Bruijning-Verhagen P, Duizer E, Vennema H, de Boer R, Kortbeek T, Roelfsema J, Smit H, Kooistra-Smid M, van Pelt W. High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care. *PLoS One.* 2014;9:e89496.
- Enserink R, van den Wijngaard C, Bruijning-Verhagen P, van Asten L, Mughini-Gras L, Duizer E, Kortbeek T, Scholts R, Nagelkerke N, Smit HA, Kooistra-Smid M, van Pelt W. Gastroenteritis attributable to 16 enteropathogens in children attending day care: significant effects of rotavirus, norovirus, astrovirus, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34:5-10.
- Erismann S, Diagbouga S, Odermatt P, Knoblauch AM, Gerold J, Shrestha A, Grissoum T, Kaboré A, Schindler C, Utzinger J, Cissé G. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among schoolchildren in the Plateau Central and Centre-Ouest regions of Burkina Faso. *Parasit Vectors.* 2016;9:554.
- Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:58–85.
- Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M, Cimerman S, Chacín-Bonilla L. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? *Acta Trop.* 2014;132:106–111.
- Escolà-Vergé L, Arando M, Vall M, Rovira R, Espasa M, Sulleiro E, Armengol P, Zarzuela F, Barberá MJ. Outbreak of intestinal amoebiasis among men who have sex with men, Barcelona (Spain), October 2016 and January 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(30).
- Esporn A, Morio F, Miegerville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonier V, Adehossi E, Lejeune A, Cam PD, Besse B, Gay-Andrieu F. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2999–3002.
- Esposito DH, Freedman DO, Neumayr A, Parola P. Ongoing outbreak of an acute muscular Sarcocystis-like illness among travellers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011-2012. *Euro Surveill.* 2012;17:20310.

- Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan-Ryan U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol*. 2003;89:399–402.
- Fan Y, Feng Y, Xiao L. Comparative genomics: how has it advanced our knowledge of cryptosporidiosis epidemiology? *Parasitol Res*. 2019;118:3195–3204.
- Faye B, Dieng T, Tine RC, Diouf L, Sylla K, Ndiaye M, Sow D, Ndiaye JL, Ndiaye D, Ndiaye M, Badiane AS, Seck MC, Dieng Y, Faye O, Ndir O, Gaye O. Cryptosporidiosis in Senegalese children: prevalence study and use of ELISA serologic diagnosis. *Bull Soc Pathol Exot*. 2013;106:258–263.
- Fayer R, Santin M, Macarasin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res*. 2012;111:1349–1355.
- Fayer R, Santin M. Epidemiology of Microsporidia in human infections. En Weiss LM, Becnel JJ (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. New Jersey, NJ, EEUU: John Wiley and Sons, Inc; 2014.
- Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev*. 1986;50:458–483.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*. 2010;124:90–97.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4303–4308.
- Feng Y, Li N, Dearen T, Lobo ML, Matos O, Cama V, Xiao L. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution genotyping of *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:4822–4828.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:110–140.
- Fernández-Huerta M, Zarzuela F, Barberá MJ, Arando M, Esperalba J, Rodríguez V, Vall M, Falcó V, García-Pérez JN, Pumarola T, Espasa M, Sulleiro E. Sexual transmission of intestinal parasites and other enteric pathogens among men who have sex with men presenting gastrointestinal symptoms in an STI unit in Barcelona, Spain: A cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101:1388–1391.

- Ferreira FS, Baptista-Fernandes T, Oliveira D, Rodrigues R, Neves E, Lima A, Garrido E, Afonso G, Zaky A, Telles de Freitas P, Atouguia J, Centeno-Lima S. *Giardia duodenalis* and soil-transmitted helminths infections in children in São Tomé and Príncipe: do we think *Giardia* when addressing parasite control? J Trop Pediatr. 2015;61:106–112.
- Ferreira FS, Centeno-Lima S, Gomes J, Rosa F, Rosado V, Parreira R, Cravo L, Atouguia J, Távora Távora L. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children from the Cufada Lagoon Natural Park, Guinea-Bissau. Parasitol Res. 2012;111:2173–2177.
- Figgatt M, Mergen K, Kimelstein D, Mahoney DM, Newman A, Nicholas D, Ricupero K, Cafiero T, Corry D, Ade J, Kurpiel P, Madison-Antenucci S, Anand M. Giardiasis outbreak associated with asymptomatic food handlers in New York State, 2015. J Food Prot. 2017;12:837–841.
- Filice FP. Studies on the cytology and life history of *Giardia* from the laboratory rat. Univ Calif Publ Zool. 1952;57:53–146.
- Filyk HA, Osborne LC. The microbiome: The intestinal ecosystem's influence on immune homeostasis, health, and disease. EBioMedicine. 2016;13:46–54.
- Flecha MJ, Benavides CM, Tissiano G, Tesfamariam A, Cuadros J, de Lucio A, Bailo B, Cano L, Fuentes I, Carmena D. Detection and molecular characterisation of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba* spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital, Oromia Region, southern Ethiopia. Trop Med Int Health. 2015;20:1213–1222.
- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. Clin Microbiol Rev. 2012;25:420–449.
- Fofana HKM, Schwarzkopf M, Doumbia MN, Saye R, Nimmegern A, Landouré A, Traoré MS, Mertens P, Utzinger J, Sacko M, Becker SL. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in schistosomiasis-endemic areas in South-Central Mali. Trop Med Infect Dis. 2019;4:86.
- Fonseca AM, Fernandes N, Ferreira FS, Gomes J, Centeno-Lima S. Intestinal parasites in children hospitalized at the Central Hospital in Maputo, Mozambique. J Infect Dev Ctries. 2014;8:786–789.
- Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res. 2008;103:1177–1181.

- Forsell J, Granlund M, Samuelsson L, Koskiniemi S, Edebro H, Evengård B. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors*. 2016;9:370.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:511–532.
- Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol*. 2011;12:194–200.
- Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, Nichols G, Rosner BM, Chalmers RM, Gorton R, Pollock KG, van der Giessen JW, Wever PC, Dorigo-Zetsma JW, Mulder B, Mank TG, Overdeest I, Kusters JG, van Pelt W, Kortbeek LM. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(2).
- Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson G, Svärd SG. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000560.
- Freire-Santos F, Oteiza-López AM, Castro-Hermida JA, García-Martín O, Ares-Mazás ME. Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res*. 2001;87:428–430.
- Frickmann H, Warnke P, Frey C, Schmidt S, Janke C, Erkens K, Schotte U, Köller T, Maaßen W, Podbielski A, Binder A, Hinz R, Queyriaux B, Wiemer D, Schwarz NG, Hagen RM. Surveillance of food- and smear-transmitted pathogens in European soldiers with diarrhea on deployment in the tropics: Experience from the European Union Training Mission (EUTM) Mali. *Biomed Res Int*. 2015;2015:573904.
- Fuentes I, Martín C, Beristain X, Mazón A, Saugar JM, Blanco A, García Cenoz M, Valle-Cristia M, Ezpeleta C, Castilla J. *Cryptosporidium hominis* genotypes involved in increased incidence and clusters of cases, Navarra, Spain, 2012. *Epidemiol Infect*. 2015;143:1033–1036.
- Gabbad AA, Elawad MA. Prevalence of intestinal parasite infection in primary school children in Elengaz area, Khartoum, Sudan. *Acad Res Int*. 2014;5:86–90.

- Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, Fenoy S, Rueda C, Fernández Vadillo C, Henriques-Gil N, del Aguila C. Molecular characterization of human-pathogenic microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* isolated from various water sources in Spain: a year-long longitudinal study. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:449–459.
- Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, Fernández Vadillo C, Peralta RH, Angulo S, Fenoy S, del Aguila C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Sci Total Environ*. 2014;468–469:368–375.
- Galván AL, Sánchez AM, Valentín MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1301–1306.
- García LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, Ryan N, Shimizu RY, Visvesvara G. Laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clin Microbiol Rev*. 2017;31:e00025-17.
- García-Rodríguez JA, Martín-Sánchez AM, Canut Blasco A, García Luis EJ. The prevalence of *Cryptosporidium* species in children in day care centres and primary schools in Salamanca (Spain): an epidemiological study. *Eur J Epidemiol*. 1990;6:432–425.
- Gardiner BJ, Simpson I, Woolley IJ. Caught in the act... a case of fulminant amoebic colitis. *JMM Case Reports*. 2015;2:e000081.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:114–28.
- Gasparinho C, Mirante MC, Centeno-Lima S, Istrate C, Mayer AC, Tavira L, Nery SV, Brito M. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years attending the Bengo General Hospital in Angola. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:e28–34.
- Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, Guèye-N'diaye A, Seng R, Samb B, M'Boup S, Aïdara-Kane A. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Infect Dis*. 2001;5:192–198.
- Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwati SK, Revathi G, Hart CA. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:78–82.
- Gathiram, V and Jackson, TF. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J*. 1987;72:669–672.

- Gabín-García LB, Bartolomé C, Abal-Fabeiro JL, Méndez S, Llovo J, Maside X. Strong genetic structure revealed by multilocus patterns of variation in *Giardia duodenalis* isolates of patients from Galicia (NW-Iberian Peninsula). *Infect Genet Evol.* 2017;48:131–141.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;385:117–171.
- GBD 2015 Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:909–948.
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017;390:1151–1210.
- Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007;102:92–99.
- Gentekaki E, Curtis BA, Stairs CW, Klimeš V, Eliáš M, Salas-Leiva DE, Herman EK, Eme L, Arias MC, Henrissat B, Hilliou F, Klute MJ, Suga H, Malik SB, Pightling AW, Kolisko M, Rachubinski RA, Schlacht A, Soanes DM, Tsaousis AD, Archibald JM, Ball SG, Dacks JB, Clark CG, van der Giezen M, Roger AJ. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol.* 2017;15:e2003769.
- Ghenghesh KS, Ghanghish K, BenDarif ET, Shembesh K, Franka E. Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium* spp. in Libya: 2000–2015. *Libyan J Med.* 2016;11:32088.
- Gil H, Cano L, de Lucio A, Bailo B, de Mingo MH, Cardona GA, Fernández-Basterra JA, Aramburu-Aguirre J, López-Molina N, Carmena D. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect Genet Evol.* 2017;50:62–69.
- Gilchrist CA, Petri SE, Schneider BN, Reichman DJ, Jiang N, Begum S, Watanabe K, Jansen CS, Elliott KP, Burgess SL, Ma JZ, Alam M, Kabir M, Haque R, Petri Jr WA. Role of the gut microbiota of children in diarrhea due to the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* 2016;213:1579–1585.
- Goetz M, Eichenlaub S, Pape GR, Hoffmann RM. Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. *Transplantation.* 2001;71:334–337.

- Goldenberg SD, Bacelar M, Brazier P, Bisnauthsing K, Edgeworth JD. A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalised patients. *J Infect.* 2015;70:504–511.
- Goldsmith R, Heyneman D (Eds.). *Tropical medicine and parasitology.* East Norwalk, CT, EEUU: Appleton and Lange; 1989.
- Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN. LSSP-PCR for characterization of stains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. *Parasitology.* 1997;114:517–520.
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1866–1870.
- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CF, Grant KA, Williamson K, Ares-Mazás ME, McLauchlin J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int J Food Microbiol.* 2004;91:279–288.
- Goñi P, Almagro-Nievas D, Cieloszyk J, Lóbez S, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Cryptosporidiosis outbreak in a child day-care center caused by an unusual *Cryptosporidium hominis* subtype. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:651–655.
- Gonzales MLM, Dans LF, Sio-Aguilar J. Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1:CD006085.
- González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 2011;108:87–93.
- Gracenea M, Castaño S, Méndez J, Lucena F, Gómez MS. Faecal contamination in public pools in Barcelona province: *Cryptosporidium* spp. and bacterial indicators. *J Water Health.* 2018;16:762–772.
- Graczyk TK, Johansson MA, Tamang L, Visvesvara GS, Moura LS, DaSilva AJ, Girouard AS, Matos O. Retrospective species identification of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from human immunodeficiency virus/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1255–1260.
- Graczyk TK, Lucy FE, Mashinsky Y, Thompson RCA, Koru O, Dasilva AJ. Human zoonotic enteropathogens in a constructed free-surface flow wetland. *Parasitol Res.* 2009;105:423–428.

- Graffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, Romano L, Masucci L. *Entamoeba dispar*: A rare case of enteritis in a patient living in a non-endemic area. *Case Rep Gastrointest Med*. 2014;2014:498058.
- Greigert V, Abou-Bacar A, Brunet J, Nourrisson C, Pfaff AW, Benarbia L, Pereira B, Randrianarivelosia M, Razafindrakoto JL, Solotiana Rakotomalala R, Morel E, Candolfi E, Poirier P. Human intestinal parasites in Mahajanga, Madagascar: The kingdom of the protozoa. *PLoS One*. 2018;13:e0204576.
- Guerrant DI, Moore SR, Lima AA, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:707–713.
- Guidetti C, Ricci L, Vecchia L. Aetiology of intestinal parasites in a sample of students from Mozambique. *Infez Med*. 2011;19:157–165.
- Gumbo T, Gangaidzo IT, Sarbah S, Carville A, Tzipori S, Wiest PM. *Enterocytozoon bieneusi* infection in patients without evidence of immunosuppression: two cases from Zimbabwe found to have positive stools by PCR. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94:699–702.
- Gumbo T, Sarbah S, Gangaidzo IT, Ortega Y, Sterling CR, Carville A, Tzipori S, Wiest PM. Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *AIDS*. 1999;13:819–821.
- Gutiérrez-Cisneros MJ, Cogollos R, López-Vélez R, Martín-Rabadán P, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino FJ, Fuentes I. Application of real-time PCR for the differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in cyst-positive faecal samples from 130 immigrants living in Spain. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104:145–149.
- Gutiérrez-Cisneros MJ, Martín-Rabadán P, Menchén L, García-Lechuz JM, Fuentes I, Gárate T, Bouza E. Autochthonous amebic liver abscess in Spain: an emerging disease? Case report and description of a PCR-based diagnostic test. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:326–330.
- Guzman-Herrador B, Carlander A, Ethelberg S, Freiesleben de Blasio B, Kuusi M, Lund V, Löfdahl M, MacDonald E, Nichols G, Schönning C, Sudre B, Trönnberg L, Vold L, Semenza JC, Nygård K. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Euro Surveill*. 2015; 20:21160.

- Gyang VP, Chuang TW, Liao CW, Lee YL, Akinwale OP, Orok A, Ajibaye O, Babasola AJ, Cheng PC, Chou CM, Huang YC, Sonko P, Fan CK. Intestinal parasitic infections: Current status and associated risk factors among school aged children in an archetypal African urban slum in Nigeria. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017;52:106–113.
- Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long-term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol.* 2013;19:8974–8985.
- Han B, Takvorian PM, Weiss LM. Invasion of host cells by Microsporidia. *Front Microbiol.* 2020;11:172.
- Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectr.* 2017;5.
- Han B, Weiss LM. Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans. *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22:903–915.
- Hanevik K, Kristoffersen E, Svard S, Bruserud O, Ringqvist E, Sørnes S, Langeland N. Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. *J Infect Dis.* 2011;204:1779–1786.
- Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005;192:2171–2173.
- Hautvast JL, Tolboom, JJ, Derks TJ, Beckers P, Sauerwein RW. Asymptomatic intestinal microsporidiosis in a human immunodeficiency virus-seronegative, immunocompetent Zambian child. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:415–416.
- Heimer J, Staudacher O, Steiner F, Kayonga Y, Havugimana JM, Musemakweri A, Harms G, Gahutu JB, Mockenhaupt FP. Age-dependent decline and association with stunting of *Giardia duodenalis* infection among schoolchildren in rural Huye district, Rwanda. *Acta Trop.* 2015;145:17–22.
- Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Stat Med.* 2002;21:2409–2419.
- Helenbrook WD, Shields WM, Whipps CM. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res.* 2015;114:2517–2525.
- Helmy YA, Klotz C, Wilking H, Krucken J, Nockler K, Von Samson-Himmelstjerna G, Zessin K-H, Aebischer T. Epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in ruminant livestock and children in the Ismailia province of Egypt: insights by genetic characterization. *Parasit Vectors.* 2014;7:321.

- Helmy YA, Krucken J, Nockler K, von Samson-Himmelstjerna G, Zessin KH. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Vet Parasitol.* 2013;193:15–24.
- Helmy YA, Samson-Himmelstjerna GV, Nockler K, Zessin KH. Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. *Epidemiol Infect.* 2015;143:1208–1218.
- Hellard M, Hocking J, Willis J, Dore G, Fairley C. Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect.* 2003;79:412–414.
- Hemphill A, Müller N, Müller J. Comparative pathobiology of the intestinal protozoan parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. *Pathogens.* 2019;8:E116.
- Heusinkveld M, Mughini-Gras L, Pijnacker R, Vennema H, Scholts R, van Huisstede-Vlaanderen KW, Kortbeek T, Kooistra-Smid M, van Pelt W. Potential causative agents of acute gastroenteritis in households with preschool children: prevalence, risk factors, clinical relevance and household transmission. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:1691–1700.
- Higuera A, Villamizar X, Herrera G, Giraldo JC, Vasquez-A LR, Urbano P, Villalobos O, Tovar C, Ramírez JD. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ.* 2020;8:e8554.
- Hirt RP, Logsdon Jr JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:580–585.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001;31:822–826.
- Hooshyar H, Rostamkhani P, Rezaeian M. Annotated checklist of the human and animal *Entamoeba* (Amoebida: Endamoebidae) species- A review article. *Iran J Parasitol.* 2015;10:146–156.
- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellstrom T, Lay-Yee R. 2001. Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet* 357:1017–1018.
- Hossain MJ, Saha D, Antonio M, Nasrin D, Blackwelder WC, Ikumapayi UN, Mackenzie GA, Adeyemi M, Jasseh M, Adegbola RA, Roose AW, Kotloff KL, Levine MM. *Cryptosporidium* infection in rural Gambian children: Epidemiology and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007607.

- Hotez PJ, Bottazzi ME, Strych U, Chang LY, Lim YA, Goodenow MM, AbuBakar S. Neglected tropical diseases among the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN): overview and update. *PLoS Neglect Trop Dis*. 2015;9: e0003575.
- Houpt ER, Bushen OY, Sam NE, Kohli A, Asgharpour A, Ng CT, Calfee DP, Guerrant RL, Maro V, Ole-Nguayine S, Shao JF. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:520–522.
- Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35:291–314.
- Huibers MHW, Moons P, Maseko N, Gushu MB, Iwajomo OH, Heyderman RS, Boele van Hensbroek M, Brienen EA, van Lieshout L, Calis JCJ. Multiplex real-time PCR detection of intestinal protozoa in HIV-infected children in Malawi: *Enterocytozoon bieneusi* is common and associated with gastrointestinal complaints and may delay BMI (nutritional status) recovery. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37:910–915.
- Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res*. 2008;102:853–860.
- Hussein AIA, Yamaguchi T, Nakamoto K, Iseki M, Tokoro M. Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. *Parasitol Int*. 2009;58:258–262.
- Ibrahim MA, Abdel-Ghany AE, Abdel-Latef GK, Abdel-Aziz SA, Aboelhadid SM. Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle, buffaloes, and humans in Egypt. *Parasitol Res*. 2016;115:2439–2448.
- Ibrahim SS, El-Matarawy OM, Ghieth MA, Abu Sarea EY, El-Badry AA. Copro prevalence and estimated risk of *Entamoeba histolytica* in diarrheic patients at Beni-Suef, Egypt. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;31:385–390.
- Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, Musemakweri A, Aebischer T, Martus P, Harms G, Mockenhaupt FP. High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1677.
- Ikeh EI, Obadofin MO, Brindeiro B, Baugherb C, Frost F, Vanderjagt D, Glew RH. Intestinal parasitism in Magama Gumau rural village and Jos township in north central Nigeria. *Niger Postgrad Med J*. 2007;14:290–295.

- Innes EA, Chalmers RM, Wells B, Pawlowic MC. A One health approach to tackle cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2020;36:290–303.
- Inpankaew T, Traub R, Thompson RC, Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2007;38:247–255.
- Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid. Indicador de Renta Disponible Bruta Municipal 2017 (avance). Noviembre 2019. Disponible en <http://www.madrid.org/iestadis/>
- Instituto Nacional de Estadística de España. España en cifras, 2019. Disponible en [www.ine.es](http://www.ine.es)
- Instituto Nacional de Estatística de Moçambique. IV Recenseamento Geral da População e Habitação, 2017. Disponible en <http://www.ine.gov.mz/>
- Irisarri-Gutiérrez MJ, Mingo MH, de Lucio A, Gil H, Morales L, Seguí R, Nacarapa E, Muñoz-Antolí C, Bornay-Llinares FJ, Esteban JG, Carmena D. Association between enteric protozoan parasites and gastrointestinal illness among HIV- and tuberculosis-infected individuals in the Chowke district, southern Mozambique. *Acta Trop.* 2017;170:197–203.
- Ismail MA, El-Akkad DM, Rizk EM, El-Askary HM, El-Badry AA. Molecular seasonality of *Giardia lamblia* in a cohort of Egyptian children: a circannual pattern. *Parasitol Res.* 2016;115:4221–4227.
- Ives RL, Kamarainen AM, John DE, Rose JB. Use of cell culture to assess *Cryptosporidium parvum* survival rates in natural groundwaters and surface waters. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5968–5970.
- Izquierdo F, Castro Hermida JA, Fenoy S, Mezo M, González-Warleta M, del Aguila C. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res.* 2011;45:4837–4843.
- Jacob AS, Busby EJ, Levy AD, Komm N, Clark CG. Expanding the *Entamoeba* universe: New hosts yield novel ribosomal lineages. *J Eukaryot Microbiol.* 2016;63:69–78.
- Jarabo MT, García-Morán NP, García-Morán JI. Prevalence of intestinal parasites in a student population. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13:464–468.
- Jarroll EL, Hoff JC, Meyer EA. Resistance of cysts to disinfection agents. En Erlandsen SL, Meyer EA (Eds.), *Giardia and giardiasis*. Boston MA, EEUU; Springer: 1984:311–328.
- Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv.* 2008;26:304–317.

- Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. Parasit Vectors. A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. 2019;12:376.
- Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TLT, Kent AD, Goldberg TL. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e683.
- Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L, Nunes B, Tenreiro R, Angelo H. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. Parasit Vectors. 2012;5:22.
- Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. Nat Immunol. 2013;14:685–690.
- Karou SD, Sanou D, Ouermi D, Pignatelli S, Pietra V, Moret R, Nikiema JB, Simporé J. Enteric parasites prevalence at Saint Camille Medical Centre in Ouagadougou, Burkina Faso. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:401–403.
- Kasaei R, Carmena D, Jelowdar A, Beirumvand M. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* in children from Behbahan, southwestern Iran. Parasitol Res. 2018;117:1425–1431.
- Kebede A, Verweij JJ, Endeshaw T, Messele T, Tasew G, Petros B, Polderman AM. The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. Ann Trop Med Parasitol. 2004;98:43–48.
- Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev Microbiol. 2002;56:93–116.
- Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species Acta Trop. 184:1–14.
- Khurana S, Chaudhary P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. Trop Parasitol. 2018;8:2–7.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980;16:111–120.
- Kimura M, Nakamura T, Nawa Y. Experience with intravenous metronidazole to treat moderate-to-severe amebiasis in Japan. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:381–385.
- King BJ, Monis PT. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. Parasitology. 2007;134:309–323.

- Knee J, Sumner T, Adriano Z, Berendes D, de Bruijn E, Schmidt WP, Nalá R, Cumming O, Brown J. Risk factors for childhood enteric infection in urban Maputo, Mozambique: A cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006956.
- Koch KL, Phillips DJ, Aber RC, Current WL. Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person-to-person transmission. *Ann Intern Med*. 1985;102:593–596.
- Kodio A, Coulibaly D, Koné AK, Konaté S, Doumbo S, Guindo A, Bittar F, Gouriet F, Raoult D, Thera MA, Ranque S. *Blastocystis* colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. *Microorganisms*. 2019;7:649.
- Koehler AV, Wang T, Haydon SR, Gasser RB. *Cryptosporidium vistorum* from the native Australian swamp rat *Rattus lutreolus* - An emerging zoonotic pathogen? *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2018;7:18–26.
- Koh WH, Geurden T, Paget T, O'Handley R, Steuart RF, Thompson RC, Buret AG. *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J Parasitol*. 2013;99:353–358.
- Korpe PS, Valencia C, Haque R, Mahfuz M, McGrath M, Houpt E, Kosek M, McCormick BJJ, Yori PP, Babji S, Kang G, Lang D, Gottlieb M, Samie A, Bessong P, Faruque ASG, Mduma E, Nshama R, Havt A, Lima IFN, Lima AAM, Bodhidatta L, Shreshtha A, Petri Jr WA, Ahmed T, Duggal P. Epidemiology and risk factors for cryptosporidiosis in children from 8 low-income sites: Results from the MAL-ED study. *Clin Infect Dis*. 2018;67:1660–1669.
- Korzeniewski K. Prevalence of intestinal protozoan infections among European UN peacekeepers in Chad, Central Africa. *Int Rev Armed Forces Med Serv*. 2012;85:57–61.
- Köster PC, Carmena D. The current molecular epidemiological scenario of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Blastocystis* in Spain. Implication for public health. En Guillen N (Ed.), *Eukaryome impact on human intestine homeostasis and mucosal immunology*. Cham, Switzerland: Springer; 2020:97–111.
- Köster PC, Pérez-Ayala A, Molina A, Trelis M, Ruiz G, García-Hortelano M, Mellado MJ, Azcona Gutiérrez JM, Martín O, Paulos S, Hernández de Mingo M, Bailo B, Salimo Muadica A, Fuentes I, Carmena D. Variabilidad genética de *Blastocystis* sp. en pacientes atendidos en hospitales públicos españoles. XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional, 27–30 de octubre 2019, Ávila (España).

- Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: Evidence for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene*. 2010;449:1–8.
- Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol*. 1998;40:321–349.
- Kotloff KL, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Farag T, Panchalingham S, Sow SO, Sur D, Zaidi AKM, Faruque ASG, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Hossain A, Das SK, Antonio M, Hossain MJ, Mandomando I, Acácio S, Biswas K, Tennant SM, Verweij JJ, Sommerfelt H, Nataro JP, Robins-Browne RM, Levine MM. The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *Lancet Glob Health*. 2019;7:e568–e584.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;82:209–222.
- Krumkamp R, Sarpong N, Schwarz NG, Adlkofer J, Loag W, Eibach D, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, Tannich E, May J. Gastrointestinal infections and diarrheal disease in Ghanaian infants and children: an outpatient case-control study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003568.
- Lalle M. Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infect Disord Drug Targets*. 2010;10:283–294.
- Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:834–838.
- Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2005;35:207–213.

- Lasek-Nesselquist E, Bogomolni AL, Gast RJ, Welch DM, Ellis JC, Sogin ML, Moore MJ. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: Variation and zoonotic potential. *Dis Aquat Organ*. 2008;81:39–51.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Thompson RC, Steuart RF, Sogin ML. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J Eukaryot Microbiol*. 2009;56:504–518.
- Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC, Wilkes L, Danziger LH. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokinet*. 1992;23:328–364.
- Laurent F, Lacroix-Lamandé S. Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*. 2017;47:711–721.
- Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O' Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, Rollins NC, Bennish ML, Nelson RG, Ward HD. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun*. 2002;70:3881–3890.
- Leelayoova S, Subrungruang I, Suputtamongkol Y, Worapong , Petmitr PP, Mungthin M. Identification of genotypes of *Enterocytozoon bienersi* from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3001–3004.
- Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today*. 1997;13:178–183.
- Leung JM, Graham AL, Knowles SCL. Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: Synthesis through an ecological lens. *Front Microbiol*. 2018;9:843.
- Levine MM, Nasrin D, Acácio S, Bassat Q, Powell H, Tennant SM, Sow SO, Sur D, Zaidi AKM, Faruque ASG, Hossain MJ, Alonso PL, Breiman RF, O'Reilly CE, Mintz ED, Omere R, Ochieng JB, Oundo JO, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Hossain A, Das SK, Antonio M, Saha D, Mandomando I, Blackwelder WC, Farag T, Wu Y, Houpt ER, Verweij JJ, Sommerfelt H, Nataro JP, Robins-Browne RM, Kotloff KL. Diarrhoeal disease and subsequent risk of death in infants and children residing in low-income and middle-income countries: analysis of the GEMS case-control study and 12-month GEMS-1A follow-on study. *Lancet Glob Health*. 2020;8:e204-e214.

- Li W, Feng Y, Santin M. Host specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and public health implications. *Trends Parasitol.* 2019a;35:436–451.
- Li W, Feng Y, Zhang L, Xiao L. Potential impacts of host specificity on zoonotic or interspecies transmission of *Enterocytozoon bieneusi*. *Infect Genet Evol.* 2019b;104033.
- Li W, Kiulia NM, Mwenda JM, Nyachieo A, Taylor MB, Zhang X, Xiao L. *Cyclospora papionis*, *Cryptosporidium hominis*, and human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* in captive baboons in Kenya. *J Clin Microbiol.* 2011;49:4326–4329.
- Li X, Palmer R, Trout JM, Fayer R. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol.* 2003;89:185–188.
- Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelinski E, Chalmers R, Santin M, Fayer R, Kvac M, Ryan U, Sak B, Stanko M, Guo Y, Wang L, Zhang L, Cai J, Roellig D, Feng Y. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:217–224.
- Li N, Xiao L, Cama VA, Ortega Y, Gilman RH, Guo M, Feng Y. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1573–1582.
- Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, Guo M, Liu L, Feng Y. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1809.
- Limaheluw J, Medema G, Hofstra N. An exploration of the disease burden due to *Cryptosporidium* in consumed surface water for sub-Saharan Africa. *Int J Hyg Environ Health.* 2019;222:856–863.
- Liu J, Platts-Mills JA, Juma , Kabir F, Nkeze J, Okoi C, Operario DJ, Uddin J, Ahmed S, Alonso PL, Antonio M, Becker SM, Blackwelder WC, Breiman RF, Faruque ASG, Fields B, Gratz J, Haque R, Hossain A, Hossain MJ, Jarju S, Qamar F, Iqbal NT, Kwambana B, Mandomando I, McMurry TL, Ochieng C, Ochieng JB, Ochieng M, Onyango C, Panchalingam S, Kalam A, Aziz F, Qureshi S, Ramamurthy T, Roberts JH, Saha D, Sow SO, Stroup SE, Sur D, Tamboura B, Taniuchi M, Tennant SM, Toema D, Wu Y, Zaidi A, Nataro JP, Kotloff KL, Levine MM, Houpt ER. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: A reanalysis of the GEMS case-control study. *Lancet.* 2016;388:1291–1301.
- Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, Gomes SJ, Traub R, McCarthy JS. Application of a multiplex quantitative PCR to assess prevalence and

- intensity of intestinal parasite infections in a controlled clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004380.
- Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, Suarez L, Gómez-Lus R. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int*. 2007;56:201–205.
- Llorente MT, Clavel A, Varea M, Goñi PM, Sahagún J, Olivera S. *Cryptosporidium felis* infection, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1471–1472.
- Lobo ML, Augusto J, Antunes F, Ceita J, Xiao L, Codices V, Matos O. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi* and other intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *PLoS One*. 2014;9:e97708.
- Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: A 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol*. 2012;42:197–205.
- López-Vélez R, Huerga H, Turrientes MC. Infectious diseases in immigrants from the perspective of a tropical medicine referral unit. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:115–121.
- López-Vélez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, Villanueva R. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14:677–681.
- López-Vélez R, Turrientes MC, Garrón C, Montilla P, Navajas R, Fenoy S, del Aguila C. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med*. 1999;6:223–227.
- Lorenzetti A. Relatório famílias hospedeiras: Análise social das comunidades rurais vivendo em zonas propensas aos desastres na provincia da Zambézia. Cruz Vermelha de Moçambique. 2013. Disponible en <https://www.redcross.org.mz/>
- Lores B, Lopez-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus–negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis*. 2002;34:918–921.
- Lucas SB, Papadaki L, Conlon C, Sewankambo N, Goodgame R, Serwadda D. Diagnosis of intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol*. 1989;42:885–887.
- Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K, Wegener Parfrey L. Are human intestinal eukaryotes beneficial or commensals? *PLoS Pathog*. 2015;11:e1005039.

- Lymbery AJ, Thompson RC. The molecular epidemiology of parasite infections: tools and applications. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;181:102–116.
- MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Eng J Med*. 1994;331:161–167.
- Maiga I, Doumbo O, Dembele M, Traoré H, Desportes-Livage I, Hilmarsdottir I, Giboyau E, Maiga L, Kassambara L, el Fakhry Y, Datry A, Gentilini M, Pichard E. Human intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali): the presence of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV seropositive patients. *Sante*. 1997;7:257–262.
- Maikai BV, Umoh JU, Lawal IA, Kudi AC, Ejembi CL, Xiao L. Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. *Exp Parasitol*. 2012;131:452–456.
- Maloney JG, Lombard JE, Urie NJ, Shivley CB, Santin M. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitol Res*. 2019a;118:575–582.
- Maloney JG, Molokin A, Rodrigues da Cunha MJ, Cury MC, Santin M. *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using Next Generation Amplicon Sequencing. *Parasite Epidemiol Control*. 2020;9:e00138.
- Maloney JG, Molokin A, Santin M. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infect Genet Evol*. 2019b;73:119–125.
- Mamo H. Intestinal parasitic infections among prison inmates and tobacco farm workers in Shewa Robit, north-central Ethiopia. *PLoS One*. 2014;9:e99559.
- Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Vallès X, Sacarlal J, Navia MM, Vila J, Alonso PL, Gascon J. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:522–527.
- Manganelli L, Berrilli F, Di Cave D, Ercoli L, Capelli G, Otranto D, Giangaspero A. Intestinal parasite infections in immigrant children in the city of Rome, related risk factors and possible impact on nutritional status. *Parasit Vectors*. 2012;5:265.
- Manko A, Motta JP, Cotton JA, Feener T, Oyeyemi A, Vallance BA, Wallace JL, Buret AG. *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*. 2017;12:e0178647.
- Marshall J, Holberton DV. Sequence and structure of a new coiled coil protein from a microtubule bundle in *Giardia*. *J Mol Biol*. 1993;231:521–530.
- Martín-Ampudia M, Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Mora L, Fernandez-Crehuet J. Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalised children with acute diarrhoea in Southern Spain. *Infection*. 2012;40:113–119.
- Martín-Sánchez AM, Canut-Blasco A, Rodríguez-Hernández J, Montes-Martínez I, García-Rodríguez JA. Epidemiology and clinical significance of *Blastocystis hominis* in different population groups in Salamanca (Spain). *Eur J Epidemiol*. 1992;8:553–559.
- Martínez-Ruiz R, de Lucio A, Fuentes I, Carmena D. Autochthonous *Cryptosporidium cuniculus* infection in Spain: First report in a symptomatic paediatric patient from Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:532–534
- Masungu P, Dube T, Makaka C. A survey of the diversity of human enteric protoctistan parasites and the associated risk factors in urban Zvishavane, Zimbabwe. *Agric Biol J North Am*. 2010;1:985–991.
- Mateo M, de Mingo MH, de Lucio A, Morales L, Balseiro A, Espí A, Barral M, Lima Barbero JF, Habela MÁ, Fernández-García JL, Bernal RC, Köster PC, Cardona GA, Carmena D. Occurrence and molecular genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in wild mesocarnivores in Spain. *Vet Parasitol*. 2017;235:86–93.
- Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D. Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93:e75.
- Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:423–445.
- Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect*. 2016;144:635–646.
- McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014;52:712–720.
- Mbae C, Mulinge E, Guleid F, Wainaina J, Waruru A, Njiru ZK, Kariuki S. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children in Kenya. *BMC Infect Dis*. 2016;16:135.

- Mbae C, Mulinge E, Waruru A, Ngugi B, Wainaina J, Kariuki S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* in children in an urban informal settlement of Nairobi, Kenya. *PLoS One*. 2015;10:e0142055.
- Medema GJ, Schets FM, Teunis PF, Havelaar AH. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:4460–4466.
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 1976;70:1156–1160.
- Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Fiori PL, Di Cave D, Viscogliosi E. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res*. 2011;109:613–619.
- Méndez Bustelo MA, do Muiño Joga M, Garabal Sánchez S, Ben López E, Llovo Taboada J. *Blastocystis hominis*, un gran desconocido *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2015;17:e39–e44.
- Mergani MH, Mohammed MA-S, Khan N, Bano M, Khan AH. Detection of intestinal protozoa by using different methods. *Dent Med Res*. 2014;2:28–32.
- Merino FJ, Köster PC, Fuentes I, Carmena D. Imported cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium hominis* IbA13G3 in Spain. The relevance of molecular-based surveillance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37:552–554.
- Meurs L, Polderman AM, Vinkeles Melchers NV, Brienen EA, Verweij JJ, Groosjohan B, Mendes F, Mechendura M, Hepp DH, Langenberg MC, Edelenbosch R, Polman K, van Lieshout L. Diagnosing polyparasitism in a high-prevalence setting in Beira, Mozambique: Detection of intestinal parasites in fecal samples by microscopy and real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005310.
- Millán R, Köster PC, Fuentes I, Carmena D. *Cryptosporidium hominis* IbA12G3: First report of a rare sub-genotype in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37:279–281.
- Mirjalali H, Latifi A, Taghipour A, Yadegar A, Hatami B, Sadeghi A, Ehsani MJ, Zali MR. Association between *Blastocystis* and body mass index in healthy subjects; a theoretical pilot study. *J Diabetes Metab Disord*. 2020;19:129–134.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms *in vitro*. *Parasitol Res*. 1999;85:103–108.

- Mohamed NS, Siddig EE, Mohamed MA, Alzein BA, Osman HHS, Tanyous EE, Elamin BK, Edris AMM. Enteroparasitosis infections among renal transplant recipients in Khartoum state, Sudan 2012-2013. *BMC Res Notes*. 2018;11:621.
- Mølbak K, Aaby P, Højlyng N, da Silva AP. Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case-control study from Guinea-Bissau, West Africa. *Am J Epidemiol*. 1994;139:734–740.
- Moles B, Torres L, Milagro A, Gorricho J, Seoane A, Navascues J. Incidence of *Cryptosporidium* in Zaragoza: an 8-year study (1989-1996). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1998;16:356–358.
- Molloy SF, Smith HV, Kirwan P, Nichols RA, Asaolu SO, Connelly L, Holland CV. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:608–613.
- Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:290–309.
- Mondal D, Petri WA Jr, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R. *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:1032–1038.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol*. 2003;3:29–38.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 2009;25:93–100.
- Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Thompson RCA. Emerging technologies for the detection and genetic characterisation of parasites. *Trends Parasitol*. 2005;21:340–346.
- Moonah SN, Jiang NM, Petri WA Jr. Host immune response to intestinal amebiasis. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003489.
- Moreno Y, Moreno-Mesonero L, Amorós I, Pérez R, Morillo JA, Alonso JL. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *Int J Hyg Environ Health*. 2018;221:102–111.

- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RCA, Olson M, Lal A, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J Eukaryot Microbiol. 2002;49:433–440.
- Morio F, Poirier P, Le Govic Y, Laude A, Valot S, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Leterrier M, Beser J, Lavergne RA, Le Pape P. Assessment of the first commercial multiplex PCR kit (ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR) for the detection of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, and *Encephalitozoon intestinalis* from fecal samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019;95:34–37.
- Morrison DA. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. Int J Parasitol. 2005;35:567–582.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. 2007;317:1921–1926.
- Morse TD, Nichols RA, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. Epidemiol Infect. 2007;135:1307–1315.
- Mosteo R, Goñi P, Miguel N, Abadías J, Valero P, Ormad MP. Bioaccumulation of pathogenic bacteria and amoeba by zebra mussels and their presence in watercourses. Environ Sci Pollut Res Int. 2016;23:1833–1840.
- Mowatt MR, Weinbach EC, Howard TC, Nash TE. Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase. Exp Parasitol. 1994;78:85–92.
- Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, Maselle SY, Langeland N. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Pediatr. 2011;11:19.
- Muadica AS, Balasegaram S, Beebeejaun K, Köster PC, Bailo B, Hernández-de-Mingo M, Dashti A, Dacal E, Saugar JM, Fuentes I, Carmena D. Risk associations for intestinal parasites in symptomatic and asymptomatic schoolchildren in central Mozambique. Clin Microbiol Infect. 2020a; doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.031.

- Muadica AS, Köster PC, Dashti A, Bailo B, Hernández-de-Mingo M, Reh L, Balasegaram S, Verlander NQ, Ruiz Chércoles E, Carmena D. Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms*. 2020b;8(4).
- Muadica AS, Messa Jr AE, Dashti A, Santin M, Manjate F, Chirinda P, Garrine M, Vubil D, Acácio S, Köster PC, Bailo B, Nhampossa T, Calero-Bernal R, Mwenda J, Mandomando I, Carmena D. First identification of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) among symptomatic and asymptomatic children in Mozambique. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020c;14:e0008419.
- Muhsen K, Cohen D, Levine MM. Can *Giardia lamblia* infection lower the risk of acute diarrhea among preschool children? *J Trop Pediatr*. 2014;60:99–103.
- Muhsen K, Levine MM. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin Infect Dis*. 2012;55(Suppl 4):S271–S293.
- Müller J, Ley S, Felger I, Hemphill A, Müller N. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:72–82.
- Mungthin M, Subrungruang I, Naaglor, T, Aimpun P, Areekul W, Leelayoova S. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. *J Med Microbiol*. 2005;54:473–476.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basáñez MG, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabé E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk

H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fèvre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gonzalez-Medina D, Gosselin R, Grainger R, Grant B, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Levinson D, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mock C, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA 3rd, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De León FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, AlMazroa MA, Memish ZA. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21

- regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197–2223.
- Mwachari C, Batchelor BI, Paul J, Waiyaki PG, Gilks CF. Chronic diarrhoea among HIV-infected adult patients in Nairobi, Kenya. *J Infect*. 1998;37:48–53.
- Nabarro LE, Lever RA, Armstrong M, Chiodini PL. Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:791–796.
- Nassar S, Oyekale T, Oluremi A. Prevalence of *Cryptosporidium* infection and related risk factors in children in Awo and Iragberi, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*. 2016;38:2–9.
- Navarro C, Domínguez-Márquez MV, Garijo-Toledo MM, Vega-García S, Fernández-Barredo S, Pérez-Gracia MT, García A, Borrás R, Gómez-Muñoz MT. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet Parasitol*. 2008;153:347–58.
- Navarro-I-Martinez L, da Silva AJ, Llovo Taboada J, Del Águila C, Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated in humans in two different locations in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:506–510.
- Navarro-i-Martinez L, del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:135–143.
- Nägeli K. U ber die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandete Organismen. *Bot Zeitung*. 1857;15:760–761.
- Ndzi ES, Asonganyi T, Nkinin MB, Xiao L, Didier ES, Bowers LC, Nkinin SW, Kaneshiro ES. Fast technology analysis enables identification of species and genotypes of latent Microsporidia infections in healthy native Cameroonians. *J Eukaryot Microbiol*. 2016;63:146–152.
- Nétor Velásquez J, Marta E, Alicia di Risio C, Etchart C, Gancedo E, Victor Chertcoff A, Bruno Malandrini J, Germán Astudillo O, Carnevale S. Molecular identification of protozoa causing AIDS-associated cholangiopathy in Buenos Aires, Argentina. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2012;42:301–308.
- Ngobeni R, Samie A, Moonah S, Watanabe K, Petri WA Jr, Gilchrist C. *Entamoeba* species in South Africa: Correlations with the host microbiome, parasite burdens, and first description of *Entamoeba bangladeshi* outside of Asia. *J Infect Dis*. 2017;216:1592–1600.

- Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Vubil D, Ruiz J, Nhalungo D, Sacoor C, Nhabanga A, Nhacolo A, Aide P, Machevo S, Sigaúque B, Nhama A, Kotloff K, Farag T, Nasrin D, Bassat Q, Macete E, Levine MM, Alonso P. Diarrheal disease in rural Mozambique: Burden, risk factors and etiology of diarrheal disease among children aged 0-59 months seeking care at health facilities. *PLoS One*. 2015;10:e0119824.
- Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Laforest-Lapointe I, Reynolds LA, Brown EM, Valdez-Salazar A, Morán-Silva P, Rojas-Velázquez L, Morien E, Parfrey LW, Jin M, Walter J, Torres J, Arrieta MC, Ximénez-García C, Finlay BB. Asymptomatic intestinal colonization with protist *Blastocystis* is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *mSystems*. 2018;3:e00007–e00018.
- Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, Cacopardo B. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *J Travel Med*. 2003;10:128–130.
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 1976;70:592–598.
- Njuguna C, Njeru I, Mgamb E, Langat D, Makokha A, Ongore D, Mathenge E, Kariuki S. Enteric pathogens and factors associated with acute bloody diarrhoea, Kenya. *BMC Infect Dis*. 2016;16:477.
- Nkenfou CN, Nana CT, Payne VK. Intestinal parasitic infections in HIV infected and non-infected patients in a low HIV prevalence region, West-Cameroon. *PLoS One*. 2013;8:e57914.
- Nkinin SW, Asonganyi T, Didier ES, Kaneshiro ES. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2841–2846.
- Nygård K, Schimmer B, Søbstad Ø, Walde A, Tveit I, Langeland N, Hausken T, Aavitsland P. A large community outbreak of waterborne giardiasis—delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health*. 2006;6:141.
- Obateru OA, Bojuwoye BJ, Olokoba AB, Fadeyi A, Fowotade A, Olokoba LB. Prevalence of intestinal parasites in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Ilorin, Nigeria. *Lexandria J Med*. 2017;53:111–116.
- O'Handley RM. *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate? *Trends Parasitol*. 2007;23:477–480.
- Ojuromi OT, Duan L, Izquierdo F, Fenoy SM, Oyibo WA, Del Aguila C, Ashafa AO, Feng Y, Xiao L. Genotypes of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in human

- immunodeficiency virus-infected patients in Lagos, Nigeria. *J Eukaryot Microbiol.* 2016;63:414–418.
- Ojuromi OT, Izquierdo F, Fenoy S, Fagbenro-Beyioku A, Oyibo W, Akanmu A, Odunukwe N, Henriques-Gil N, del Aguila C. Identification and characterization of microsporidia from fecal samples of HIV-positive patients from Lagos, Nigeria. *PLoS One.* 2012;7:e35239.
- Ok UZ, Cirit M, Uner A, Ok E, Akçiçek F, Başçi A, Özcel MA. Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients. *Nephron.* 1997;75:171–174.
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis.* 1999;180:1275–1281.
- Oliveira D, Ferreira FS, Atouguia J, Fortes F, Guerra A, Centeno-Lima S. Infection by intestinal parasites, stunting and anemia in school-aged children from Southern Angola. *PLoS One.* 2015;10:e0137327.
- Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, Caliarí MV. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol.* 2015;5:9–14.
- Oliveira-Arbex AP, David ÉB, Tenório MDS, Cicchi PJP, Patti M, Coradi ST, Lucheis SB, Jim J, Guimarães S. Diversity of *Blastocystis* subtypes in wild mammals from a zoo and two conservation units in southeastern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2020;78:104053.
- Omarova A, Tussupova K, Berndtsson R, Kalishev M, Sharapatova K. Protozoan parasites in drinking water: A system approach for improved water, sanitation and hygiene in developing countries *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15:495.
- Organización de las Naciones Unidas. End preventable deaths: Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia and Diarrhoea. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2013.
- Organización de las Naciones Unidas. United Nations Statistics Division - National Accounts. Enero 2019. Disponible en <https://unstats.un.org/unsd/snaama/Index>
- Organización Mundial de la Salud. Drinking Water Parameter Cooperation Project. Support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive). Geneva, Switzerland; 2017.
- Organización Mundial de la Salud. Global Health Estimates 2015: Burden of disease by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2015. Geneva, Switzerland; 2016.
- Organización Mundial de la Salud. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007–2015. Geneva, Switzerland; 2015.

- Ortega MT, Vergara A, Guimbao J, Clavel A, Gavín P, Ruiz A. *Cryptosporidium hominis* diarrhea outbreak and transmission linked to diaper infant use. *Med Clin (Barc)*. 2006;127:653–656.
- Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, Pereira B, Razakandrainibe R, Pinon A, Lambert C, Wawrzyniak I, Dabboussi F, Delbac F, Favennec L, Hamze M, Viscogliosi E, Certad G. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004496.
- Oyerinde JP, Alonge AA, Adegbite-Hollist AF, Ogunbi O. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a Nigerian urban population. *Int J Epidemiol*. 1979;8:55–59.
- Palos Ladeiro M, Bigot A, Aubert D, Hohweyer J, Favennec L, Villena I, Geffard A. Protozoa interaction with aquatic invertebrate: Interest for watercourses biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2013;20:778–789.
- Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng B, Oundo J, Ramamurthy T, Tamboura B, Zaidi AKM, Petri W, Houghton E, Murray P, Prado V, Vidal R, Steele D, Strockbine N, Sansonetti P, Glass RI, Robins-Browne RM, Tauschek M, Svennerholm A-M, Berkeley LY, Kotloff K, Levine MM, Nataro JP. Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin Infect Dis*. 2012;55(Suppl 4):S294–S302.
- Parfrey LW, Barbero E, Lasser E, Dunthorn M, Bhattacharya D, Patterson DJ, Katz LA. Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity. *PLoS Genet*. 2006;2:e220.
- Parfrey LW, Walters WA, Knight R. Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Front Microbiol*. 2011;2:153.
- Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol*. 2010;169:8–17.
- Parsons MB, Travis D, Lonsdorf EV, Lipende I, Roellig DM, Roellig DM, Collins A, Kamenya S, Zhang H, Xiao L, Gillespie TR. Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates, and domesticated animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003529.
- Pasqui AL, Savini E, Saletti M, Guzzo C, Puccetti L, Auteri A. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: A case report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004;8:117–120.

- Paulos S, Köster PC, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Cardona GA, Fernández-Crespo JC, Stensvold CR, Carmena D. Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses Public Health*. 2018;65:993–1002.
- Paulos S, Mateo M, de Lucio A, Hernández-de Mingo M, Bailo B, Saugar JM, Cardona GA, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J Microbiol Methods*. 2016;127:68–73.
- Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. *PLoS One*. 2019;14:e0215068.
- Pedraza Dueñas A, Ripoll Lozano MA, Sahagún Salcedo B. Infestation by *Giardia lamblia* of children in the basic health area of East Rural Avila. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*. 1994;68:399–404.
- Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, Bern C, Sulaiman IM, Glaberman S, Lal AA, Xiao L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol*. 2001;Suppl:28S–31S.
- Peng MM, Meshnick SR, Cunliffe NA, Thindwa BD, Hart CA, Broadhead RL, Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50 Suppl:557–559.
- Pérez Armengol C, Ariza Astolfi C, Ubeda Ontiveros JM, Guevara Benítez DC, de Rojas Alvarez M, Lozano Serrano C. Epidemiology of children's intestinal parasitism in the Guadalquivir Valley, Spain. *Rev Esp Salud Publica*. 1997;71:547–552.
- Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA. Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:638–639.
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:39–64.
- Petri WA Jr. Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:443–447.

- Pijnacker R, Mughini-Gras L, Heusinkveld M, Roelfsema J, van Pelt W, Kortbeek T. Different risk factors for infection with *Giardia lamblia* assemblages A and B in children attending daycare centres. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:2005–2013.
- Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M. Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Parasit Vectors*. 2012;5:37.
- Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleeschauwer B, Hall AJ, Kirk MD, Duarte AS, Black RE, Angulo FJ. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One*. 2015;10:e0142927.
- Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, McCormick BJ, McGrath M, Paredes Olortegui M, Samie A, Shakoor S, Mondal D, Lima IF, Hariraju D, Rayamajhi BB, Qureshi S, Kabir F, Yori PP, Mufamadi B, Amour C, Carreon JD, Richard SA, Lang D, Bessong P, Mduma E, Ahmed T, Lima AA, Mason CJ, Zaidi AK, Bhutta ZA, Kosek M, Guerrant RL, Gottlieb M, Miller M, Kang G, Houpt ER, MAL-ED Network Investigators. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health*. 2015;3:e564–e575.
- Plorde JJ. Rhizopods. En Ryan KJ, Ray CG (Eds.), *Sherris Medical Microbiology: An introduction to infectious diseases*. Unites States: McGraw Hill; 2004:733–740.
- Pol S, Romana C, Richard S, Carnot F, Dumont JL, Bouche H, Pialoux G, Stern M, Pays JF, Berthelot P. *Enterocytozoon bieneusi* infection in acquired immunodeficiency syndrome-related sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 1992;102:1778–1781.
- Ponce Gordo F, Herrera S, Castro AT, García Durán B, Martínez Díaz RA. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Vet Parasitol*. 2002;107:137–160.
- Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hänninen ML, Kaarna A, Meri T, Kuusi M. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Euro Surveill*. 2009;14(28).
- Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:175–179.
- Power ML, Cheung-Kwok-Sang C, Slade M, Williamson S. *Cryptosporidium fayeri*: diversity within the *gp60* locus of isolates from different marsupial hosts. *Exp Parasitol*. 2009;121:219–223.

- Poxleitner MK, Carpenter ML, Mancuso JJ, Wang CJ, Dawson SC, Cande WZ. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science*. 2008;319:1530–1533.
- Pozio E. How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Exp Parasitol*. 2020;208:107807.
- Priest JW, Bern C, Xiao L, Roberts JM, Kwon JP, Lescano AG, Checkley W, Cabrera L, Moss DM, Arrowood MJ, Sterling CR, Gilman RH, Lammie PJ. Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:123–131.
- Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:1154–1160.
- Puthia MK, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell*. 2008;7:435–443.
- Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun*. 2006;74:4114–4122.
- Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res*. 2005;97:386–389.
- Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5491–5497.
- Raccurt CP, Agnamey P, Sarfati C, Chouaki T, Totet A. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in a patient infected with HIV-1: first reported case in Chad. *Med Trop (Mars)*. 2008;68:307–308.
- Rafiei A, Baghlaninezhad R, Köster PC, Bailo B, Hernández de Mingo M, Carmena D, Panabad E, Beiromvand M. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Southwestern Iran. A community survey. *PLoS One*. 2020;15:e0228317.
- Rahmouni I, Essid R, Aoun K, Bouratbine A. Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle cryptosporidiosis in the rural region of Northern Tunisia. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90:346–350.
- Rajurkar MN, Lall N, Basak S, Mallick SK. A simple method for demonstrating the *Giardia lamblia* trophozoite. *J Clin Diagn Res*. 2012;6:1492–1494.

- Ralston KS, Solga MD, Mackey-Lawrence NM, Somlata, Bhattacharya A, Petri WA Jr. Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*. 2014;508:526–530.
- Ramo A, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C, Quílez J. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and finished drinking water in north-eastern Spain. *Sci Total Environ*. 2017;580:1007–1013.
- Ramo A, Quílez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, Del Cacho E, Clavel A. Multilocus typing and population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. *Infect Genet Evol*. 2015;31:190–197.
- Randremanana R, Randrianirina F, Gousseff M, Dubois N, Razafindratsimandresy R, Hariniana ER, Garin B, Randriamanantena A, Rakotonirina HC, Ramparany L, Ramarokoto CE, Rakotomanana F, Ratsitorahina M, Rajatonirina S, Talarmin A, Richard V. Case-control study of the etiology of infant diarrheal disease in 14 districts in Madagascar. *PLoS One*. 2012;7:e44533.
- Ras R, Huynh K, Desoky E, Badawy A, Widmer G. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol*. 2015;45:567–573.
- Rath S, Rud T, Karch A, Pieper DH, Vital M. Pathogenic functions of host microbiota. *Microbiome*. 2018;6:174.
- Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*. 2004;4:125–130.
- Real Decreto 902/2018, Por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, y las especificaciones de los métodos de análisis. BOE 1 agosto 2018, 10940, Nº 185, Sec I pg 77350.
- Reed SL, Keene WE, McKerrrow JH. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2772–2777.
- Reh L, Muadica AS, Köster PC, Balasegaram S, Verlander NQ, Chércoles ER, Carmena D. Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Euro Surveill*. 2019;24(43).
- Rehbein S, Klotz C, Ignatius R, Müller E, Aebischer A, Kohn B. *Giardia duodenalis* in small animals and their owners in Germany: A pilot study. *Zoonoses Public Health*. 2019;66:117–124.

- Reiner RC Jr, Graetz N, Casey DC, Troeger C, Garcia GM, Mosser JF, Deshpande A, Swartz SJ, Ray SE, Blacker BF, Rao PC, Osgood-Zimmerman A, Burstein R, Pigott DM, Davis IM, Letourneau ID, Earl L, Ross JM, Khalil IA, Farag TH, Brady OJ, Kraemer MUG, Smith DL, Bhatt S, Weiss DJ, Gething PW, Kassebaum NJ, Mokdad AH, Murray CJL, Hay SI. Local variation in childhood diarrheal morbidity and mortality in Africa, 2000-2015. *N Engl J Med*. 2018;379:1128–1138.
- Renelies-Hamilton J, Noguera-Julian M, Parera M, Paredes R, Pacheco L, Dacal E, Saugar JM, Rubio JM, Poulsen M, Köster PC, Carmena D. Exploring interactions between *Blastocystis* sp., *Strongyloides* spp. and the gut microbiomes of wild chimpanzees in Senegal. *Infect Genet Evol*. 2019;74:104010.
- Richardson DJ, Callahan KD, Dondji B, Tsekeng P, Richardson KE. Prevalence of waterborne protozoan parasites in two rural villages in the West Province of Cameroon. *Comp Parasitol*. 2011;78:180–184.
- Rivero-Juarez A, Dashti A, Lopez-Lopez P, Muadica AS, Rivalde MdA, Köster PC, Machuca I, Bailo B, Hernández de Mingo M, Dacal E, García-Bocanegra I, Saugar JM, Calero-Bernal R, González-Barrio D, Rivero A, Briz V, Carmena D. Protist enteroparasite in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in Southern Spain: A protective effect on Hepatitis E acquisition? *Parasit Vectors*. 2020;13:281.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014;6:17.
- Rodríguez-Hernández J, Canut-Blasco A, Martín-Sánchez AM. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *Eur J Epidemiol*. 1996;12:291–295.
- Rodríguez-Salinas Pérez E, Aragón Peña AJ, Allue Tango M, López Pérez MA, Jiménez Maldonado M, Domínguez Rodríguez MJ. Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (Autonomous Community of Madrid). *Rev Esp Salud Publica*. 2000;74:527–536.
- Rojas-Lopez L, Elwin K, Chalmers RM, Enemark HL, Beser J, Troell K. Development of a *gp60*-subtyping method for *Cryptosporidium felis*. *Parasit Vectors*. 2020;13:39.
- Roka M, Goni P, Rubio E, Clavel A. Prevalence of intestinal parasites in HIV-positive patients on the island of Bioko, Equatorial Guinea: its relation to sanitary conditions and socioeconomic factors. *Sci Total Environ*. 2012;432:404–411.

- Roka M, Goñi P, Rubio E, Clavel A. Intestinal parasites in HIV-seropositive patients in the Continental Region of Equatorial Guinea: its relation with socio-demographic, health and immune systems factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107:502–510.
- Rossignol JF, Kabil SM, El-Gohary Y, Younis AM. Nitazoxanide in the treatment of amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1025–1031.
- Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:987–991.
- Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ. The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res.* 2017;116:1–11.
- Ross D. Ireland: History of a nation. New Lanark, Scotland: Geddes and Grosset; 2002.
- Rossen NG, Bart A, Verhaar N, van Nood E, Kootte R, de Groot PF, D’Haens GR, Ponsioen CY, van Gool T. Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:1039–1044.
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:313–323.
- Roure S, Valerio L, Soldevila L, Salvador F, Fernández-Rivas G, Sulleiro E, Mañosa M, Sopena N, Mate JL, Clotet B. Approach to amoebic colitis: Epidemiological, clinical and diagnostic considerations in a non-endemic context (Barcelona, 2007-2017). *PLoS One.* 2019;14:e0212791.
- Royer TL, Gilchrist C, Kabir M, Arju T, Ralston KS, Haque R, Clark CG, Petri WA Jr. *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1543-1545.
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD, Kirk PM. A higher level classification of all living organisms. *PLoS One.* 2015;10:e0119248.
- Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol.* 2013;43:943–956.
- Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology.* 2014;41:1667–1685.
- Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *Int J Parasitol.* 2019;49:1–11.
- Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol.* 2018;48:1–12.

- Ryan U, Papparini A, Oskam C. New technologies for detection of enteric parasites. *Trends Parasitol.* 2017;33:532–546.
- Saffo Z, Mirza N. Successful treatment of *Enterocytozoon bieneusi* gastrointestinal infection with nitazoxanide in an immunocompetent patient. *IDCases.* 2019;18:e00586.
- Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:81–83.
- Saidin S, Othman N, Noordin R. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38:15–38.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406–425.
- Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, Tolarová V, Hůzová Z, Kváč M. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1064–1070.
- Sak B, Petrzalkova KJ, Kvetonova D, Mynarova A, Shutt KA, Pomajbikova K, Kalousova B, Modry D, Benavides J, Todd A, Kvac M. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS One.* 2013;8:e71840.
- Salinas JL, Vildozola Gonzales H. Infección por *Blastocystis*. *Rev Gastroenterol Peru.* 2007;27:264–274.
- Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Alonso C, Santos J, Fuentes I, Molina I. Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasit Vectors.* 2016;9:548.
- Salyer SJ, Gillespie TR, Rwego IB, Chapman CA, Goldberg TL. Epidemiology and molecular relationships of *Cryptosporidium* spp. in people, primates, and livestock from Western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1597.
- Samie A, Barrett LJ, Bessong PO, Ramalivhana JN, Mavhandu LG, Njayou M, Guerrant RL. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* in the context of HIV and AIDS: the case of Vhembe district, in South Africa's Limpopo province. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010;104:55–63.

- Samie A, Obi CL, Bessong PO, Houpt E, Stroup S, Njayer M, Sabeta C, Mduluzi T, Guerrant RL. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of African strains based on the polymorphism of the serine-rich protein gene. *Exp Parasitol*. 2008;18:354–361.
- Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:547–554.
- Samie A, Makuwa S, Mtshali S, Potgieter N, Thekiso O, Mbatlana P, Bessong PO. Parasitic infection among HIV/AIDS patients at Bela-Bela clinic, Limpopo province, South Africa with special reference to *Cryptosporidium*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2014;45:783–795.
- Samie A, Tanih NF, Seisa I, Seheri M, Mphahlele J, ElBakri A, Mbatlana P. Prevalence and genetic characterization of *Giardia lamblia* in relation to diarrhea in Limpopo and Gauteng provinces, South Africa. *Parasite Epidemiol Control*. 2020;9:e00140.
- Samra NA, Jori F, Cacciò SM, Freaux J, Poonsamy B, Thompson PN. *Cryptosporidium* genotypes in children and calves living at the wildlife or livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 2016;83:1–7.
- Sánchez A, Muñoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, Restrepo C, Ruiz M, Reyes P, Qian Y, Xiao L, López MC, Ramírez JD. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Front Microbiol*. 2017;8:248.
- Sangaré I, Bamba S, Cissé M, Zida A, Bamogo R, Sirima C, Yaméogo BK, Sanou R, Drabo F, Dabiré RK, Guiguemdé RT. Prevalence of intestinal opportunistic parasites infections in the University Hospital of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Infect Dis Poverty*. 2015;4:32.
- Santamaría J, Toranzos GA. Enteric pathogens and soil: a short review. *Int Microbiol*. 2003;6:5–9.
- Santín M. *Enterocytozoon bieneusi*. En Xiao L, Ryan U, Feng Y (Eds.), *Biology of foodborne parasites*. Boca Raton, FL, EEUU: CRC Press; 2015:149–174.
- Santín M, Calero-Bernal R, Carmena D, Mateo M, Balseiro A, Barral M, Lima Barbero JF, Habela MÁ. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in wild carnivores in Spain. *J Eukaryot Microbiol*. 2018;65:468–474.
- Santín M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol*. 2009;56:34–38.

- Santín M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci*. 2011;90:363–371.
- Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, Derouin F, Ngole EM, Molina JM. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:162–164.
- Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72:519–521.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*. 2006;22:203–208.
- Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: Qualitative assessment using culture-dependent and-independent analysis of faeces. *ISME J*. 2008;2:1183.
- Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;90:326–30.
- Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol*. 2013;29:523–529.
- Scanlan PD. *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol*. 2012;28:327–334.
- Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006; 57:77–85.
- Seguí R, Muñoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Köster PC, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Puente P, Toledo R, Esteban JG, Carmena D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasit Vectors*. 2018;11:490.
- Segura R, Prim N, Montemayor M, Valls ME, Muñoz C. Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: a five-year study. *PLoS One*. 2015;10:e0121753.
- Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Semra Güreşer A, Turgal E, Imir T, Taylan-Ozkan A. Epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96:1164–1170.

- Shad S, Hanif F, Ul Haq M, Luck NH, Aziz T, Mubarak M. Frequencies of common infectious organisms causing chronic diarrhea in renal transplant patients. *Exp Clin Transplant*. 2019;17:212–215.
- Shafiei Z, Esfandiari F, Sarkari B, Rezaei Z, Fatahi MR, Hosseini Asl SMK. 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 Res Notes*. 2020;13:264.
- Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y. Thoracic amebiasis. *Clin Chest Med*. 2002;23:479–492.
- Shimelis T, Tassachew Y, Lambiyu T. *Cryptosporidium* and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: Significance of improved HIV-related care Parasit Vectors. 2016;9:270.
- Shin JH, Lee SE, Kim TS, Ma DW, Cho SH, Chai JY, Shin EH. Development of molecular diagnosis using multiplex real-time PCR and T4 phage internal control to simultaneously detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayetanensis* from human stool samples. *Korean J Parasitol*. 2018;56:419–427.
- Shirley DT, Farr L, Watanabe K, Moonah S. A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5:ofy161.
- Shirley DT, Watanabe K, Moonah S. Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0007744.
- Siala E, Toumi I, Bétttaieb J, Boulehmi N, Zallega N, Aoun K, Bouratbine A. Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis in the region of Tunis from 1996 at 2012. *Tunis Med*. 2015;93:687–691.
- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 1996;380:398.
- Sim S, Yu JR, Lee YH, Lee JS, Jeong HG, Mohamed AA, Hong ST. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among inhabitants of 2 rural areas in White Nile State, Sudan. *Korean J Parasitol*. 2015;53:745–747.
- Siripattanapong S, Leelayoova S, Mungthin M, Thompson RCA, Boontanom P, Saksirisampant W, Tan-Ariya P. Clonal diversity of the glutamate dehydrogenase gene in *Giardia duodenalis* from Thai isolates: Evidence of genetic exchange or mixed infections? *BMC Microbiol*. 2011;11:206.
- Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, Olsen A. Seasonal prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105:102–108.

- Siwila J, Phiri IG, Vercruyssen J, Goma F, Gabriel S, Claerebout E, Geurden T. Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:733–734.
- Slapeta J. *Cryptosporidium* species found in cattle: A proposal for a new species. *Trends Parasitol.* 2006;22:469–474.
- Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RCA. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 2006;22:160–167.
- Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull World Health Organ.* 1982;60:605.
- Soliman RH, Fuentes I, Rubio JM. Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol Int.* 2011;60:507–511.
- Soriano JM, Domènech G, Martínez MC, Mañes J, Soriano F. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Trop Biomed.* 2011;28:557–562.
- Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res.* 2010;106:505–511.
- Sow SO, Muhsen K, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Farag TH, Panchalingam S, Sur D, Zaidi AK, Faruque AS, Saha D, Adegbola R, Alonso PL, Breiman RF, Bassat Q, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Hossain A, Das SK, Antonio M, Hossain MJ, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Omere R, Oundo JO, Ochieng JB, Mintz ED, O'Reilly CE, Berkeley LY, Livio S, Tennant SM, Sommerfelt H, Nataro JP, Ziv-Baran T, Robins-Browne RM, Mishcherkin V, Zhang J, Liu J, Houpt ER, Kotloff KL, Levine MM. The burden of *Cryptosporidium* diarrheal disease among children < 24 months of age in moderate/high mortality regions of sub-Saharan Africa and South Asia, utilizing data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004729.
- Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S. The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:575–586.
- Sprague V, Becnel JJ. Note on the name-author-date combination for the taxon *Microsporidies Balbiani, 1882*, when ranked as a phylum. *J Invertebr Pathol.* 1998;71:91–94.

- Sprague V. Classification and phylogeny of the microsporidia. En Bulla LA, Cheng TC (Eds.), *Comparative Pathology*, vol. 2. New York, NY, EEUU: Plenum Press; 1976:1–30.
- Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW; ZOOPNET network and partners. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e558.
- Squire SA, Ryan U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit Vectors*. 2017;10:195.
- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003;361:1025–1034.
- Stark D, Barratt JL, van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:634–650.
- Stark KD, Arroyo Kuribrena M, Dauphin G, Vokaty S, Ward MP, Wieland B, Lindberg A. One Health surveillance – more than a buzz word? *Prev Vet Med*. 2015;120:124–130.
- Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box. *Trends Parasitol*. 2012;28:305.
- Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol*. 2013;3:26–34.
- Stensvold CR. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* sp. *Trop Parasitol*. 2015;5:3–5.
- Stensvold CR. Pinning down the role of common luminal intestinal parasitic protists in human health and disease - status and challenges. *Parasitology*. 2019;146:695–701.
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009;39:473–479.
- Stensvold CR, Beser J, Axen C, Lebbad M. High applicability of a novel method for *gp60*-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2311–2319.
- Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea *Am J Trop Med Hyg*. 2011a;84:883–885.
- Stensvold CR, Clark CG. Pre-empting Pandora's Box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends Parasitol*. 2020;36:229–232.
- Stensvold CR, Elwin K, Winięcka-Krusnell J, Chalmers RM, Xiao L, Lebbad M. Development and application of a *gp60*-based typing assay for *Cryptosporidium viatorum*. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1891–1897.

- Stensvold CR, Lebbad M, Verweij JJ. The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. *Trends Parasitol.* 2011b;27:53–58.
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol.* 2007;23:93–96.
- Stensvold CR, van der Giezen M. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends Parasitol.* 2018;34:369–377.
- Stentiford GD, Bass D, Williams BAP. Ultimate opportunists-The emergent *Enterocytozoon* group Microsporidia. *PLoS Pathog.* 2019;15:e1007668.
- Strong WB, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun.* 2000;68:4117–4134.
- Sulaiman IM, Bern C, Gilman R, Cama V, Kawai V, Vargas D, Ticona E, Vivar A, Xiao L. A molecular biologic study of *Enterocytozoon bieneusi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. *J Eukaryot Microbiol.* 2003a;50:S591–S596.
- Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 2003b;9:1444–1452.
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2805–2809.
- Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:3776–3780.
- Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:509–511.
- Tachibana H, Yanagi T, Pandey K, Cheng XJ, Kobayashi S, Sherchand JB, Kanbara H. An *Entamoeba* sp. strain isolated from rhesus monkey is virulent but genetically different from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;153:107–14.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725–2729.

- Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:639–665.
- Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 2010;12:28–35.
- Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res.* 2006;98:189–193.
- Tan TC, Suresh KG, Smith HV. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol Res.* 2008;104:85–93.
- Taniuchi M, Verweij JJ, Sethabutr O, Bodhidatta L, Garcia L, Maro A, Kumburu H, Gratz J, Kibiki G, Houpt ER. Multiplex polymerase chain reaction method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and Microsporidia in stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71:386–390.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:713–729.
- Tékpa G, Fikouma V, Gbangba-Ngai E, Bogning Mejozem BO, Ningatouloum Nazita S, Koffi B. Epidemiological and clinical profile of intestinal parasitosis of children in rural areas in Central African Republic. *Arch Pediatr.* 2018;26:34–37.
- Tellevik MG, Moyo SJ, Blomberg B, Hjøllø T, Maselle SY, Langeland N, Hanevik K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among young children with and without diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004125.
- ten Hove RJ, Van Lieshout L, Beadsworth MB, Perez MA, Spee K, Claas EC, Verweij JJ. Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Eukaryot Microbiol.* 2009;56:388–393.
- Teodorovic S, Braverman JM, Elmendorf HG. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1421–1430.
- Thibault A, Amat CB, Motta J-P, Manko A, Buret AG. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers.* 2017;5:e1274354.
- Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia* species. En Lujan HD, Svärd S (Eds.), *Giardia. A model organism.* Vienna, Austria: Springer; 2011:3–15.
- Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health.* 2002;7:357–364.

- Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, Lima-Mendez G, Wang J, Vieira-Silva S, Falony G, Hildebrand F, Darzi Y, Rymenans L, Verspecht C, Bork P, Vermeire S, Joossens M, Raes J. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*. 2019;68:1180–1189.
- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, Bateman KS, Sriurairatana S, Chavadej J, Sritunyalucksana K, Withyachumnarnkul B. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *J Invertebr Pathol*. 2009;102:21–29.
- Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson ID, Thompson RCA. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok--a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop*. 2009;111:125–132.
- Trevisan C, Torgerson PR, Robertson LJ. Foodborne parasites in Europe: Present status and future trends. *Trends Parasitol*. 2019;35:695–703.
- Troeger C, Blacker BF, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Zimsen SR, Albertson SB, Stanaway JD, Deshpande A, Abebe Z, Alvis-Guzman N, Amare AT, Asgedom SW, Anteneh ZA, Antonio CAT, Aremu O, Asfaw ET, Atey TM, Atique S, Avokpaho EFG, Ayele HT, Barac A, Barreto ML, Bassat Q, Belay SA, Bensenor IM, Bhutta ZA, Bijani A, Bizuneh H, Castañeda-Orjuela CA, Dadi AF, Dandona L, Dandona R, Do HP, Dubey M, Dubljanin E, Edessa D, Endries AY, Eshrati B, Farag T, Feyissa GT, Foreman KJ, Forouzanfar MH, Fullman N, Gething PW, Gishu MD, Godwin WW, Gughani HG, Gupta R, Hailu GB, Hassen HY, Hibstu DT, Ilesanmi OS, Jonas JB, Kahsay A, Kang G, Kasaeian A, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khan MA, Khang Y-H, Kisosoon N, Kochhar S, Kotloff KL, Koyanagi A, Kumar GA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Malta DC, Mehata S, Mendoza W, Mengistu DT, Menota BG, Mezgebe HB, Mlashu FW, Murthy S, Naik GA, Nguyen CT, Nguyen TH, Ningrum DNA, Ogbo FA, Olagunju AT, Paudel D, Platts-Mills JA, Qorbani M, Rafay A, Rai RK, Rana SM, Ranabhat CL, Rasella D, Ray SE, Reis C, Renzaho AM, Rezai MS, Ruhago GM, Safiri S, Salomon JA, Sanabria JR, Sartorius B, Sawhney M, Sepanlou SG, Shigematsu M, Sisay M, Somayaji R, Sreeramareddy CT, Sykes BL, Taffere GR, Topor-Madry T, Tran BX, Tuem KB, Ukwaja KN, Vollset SE, Walson JL, Weaver MR, Weldegewergs KG, Werdecker A, Workicho A, Yenesew M, Yirsaw BD, Yonemoto N, Zaki MES, Vos T, Lim SS, Naghavi M, Murray CJ, Mokdad AH, Hay SI, Reiner Jr RC. Estimates of the global, regional, and national

- morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:1211–1228.
- Tshalaia LE. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Med Parazit (Moscow)*. 1941;10:244–252.
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:921–925.
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:299–303.
- Tyzzar EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907;5:12–13.
- Tyzzar EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkunde.* 1912;26:394–412.
- Valença-Barbosa C, do Bomfim TCB, Teixeira BR, Gentile R, Neto SFDC, Magalhães BSN, Balthazar DA, da Silva FA, Biot R, d'Avila Levy CM, Santos HLC. Molecular epidemiology of *Blastocystis* isolated from animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2019;14:e0210740.
- van Gool T, Luderhoff E, Nathoo KJ, Kiire CF, Dankert J, Mason PR. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* infections among HIV-positive individuals with persistent diarrhoea in Harare, Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:478–480.
- van Hal SJ, Muthiah K, Matthews G, Harkness J, Stark D, Cooper D, Marriott D. Declining incidence of intestinal microsporidiosis and reduction in AIDS-related mortality following introduction of HAART in Sydney, Australia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1096–1100.
- van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:520–528.
- Verweij JJ, Oostvogel F, Brienen EA, Nang-Beifubah A, Ziem J, Polderman AM. Short communication: Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. *Trop Med Int Health.* 2003a;8:1153–1156.
- Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes.* 2003b;17:223–225.

- Villanueva-Garcia C, Gordillo-Chavez EJ, Lopez-Escamilla E, Rendon-Franco E, Muñoz-Garcia CI, Gama L, Martinez-Flores WA, Gonzalez-Rodriguez N, Romero-Valdovinos M, Diaz-Lopez H, Galian J, Villalobos G, Maravilla P, Martinez-Hernandez F. Clarifying the cryptic host specificity of *Blastocystis* spp. isolates from *Alouatta palliata* and *A. pigra* howler monkeys. *PLoS One*. 2017;12:e0169637.
- Vivancos V, González-Alvarez I, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez M. Giardiasis: Characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. *Curr Top Med Chem*. 2018;18:1287–1303.
- Visvesvara GS. *In vitro* cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:401–413.
- Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.*, 2007;102:10–19.
- von Huth S, Kofoed PE, Holmskov U. Prevalence and potential risk factors for gastrointestinal parasitic infections in children in urban Bissau, Guinea-Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019;trz032.
- Vouking MZ, Enoka P, Tamo CV, Tadenfok CN. Prevalence of intestinal parasites among HIV patients at the Yaoundé Central Hospital, Cameroon. *Pan Afr Med J*. 2014;18:136.
- Waldram A, Vivancos R, Hartley C, Lamden K. Prevalence of *Giardia* infection in households of *Giardia* cases and risk factors for household transmission. *BMC Infect Dis*. 2017;17:486.
- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*. 1986;8:228–238.
- Wang J, Gong B, Liu X, Zhao W, Bu T, Zhang W, Liu A, Yang F. Distribution and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in various mammal and bird species in northeastern China. *Parasit Vectors*. 2018a;11:522.
- Wang Y, Gonzalez-Moreno O, Roellig DM, Oliver L, Huguet J, Guo Y, Feng Y, Xiao L. Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasit Vectors*. 2019;12:432.
- Wang RJ, Li JQ, Chen YC, Zhang LX, Xiao LH. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Trop*. 2018c;187:257–263.

- Wang Z-D, Lu Q, Liu H-H, Li S, Zhang L, Zhao Y-K, Zhu X-Q. Prevalence of *Cryptosporidium*, Microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: A global systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2018b;11:28.
- Wang L, Zhang H, Zhao X, Zhang L, Zhang G, Guo M, Liu L, Feng Y, Xiao L. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*. 2013a;51:557–563.
- Wang L, Xiao L, Duan L, Ye J, Guo Y, Guo M, Liu L, Feng Y. Concurrent infections of *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, and *Clostridium difficile* in children during a cryptosporidiosis outbreak in a pediatric hospital in China. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013b;7:e2437.
- Wanyiri JW, Kanyi H, Maina S, Wang DE, Steen A, Ngugi P, Kamau T, Waithera T, O'Connor R, Gachuhi K, Wamae CN, Mwamburi M, Ward HD. Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in Kenya: clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91:319–328.
- Weber R, Deplazes P, Schwartz D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol*. 2000;6:166–192.
- Weber R, Kuster H, Keller R, Bächli T, Spycher MA, Briner J, Russi E, Lüthy R. Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146:1603–1605.
- Weiss LM, Becnel JJ. *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. New Jersey, NJ, EEUU: John Wiley and Sons, Inc; 2014.
- White KE, Hedberg CW, Edmonson LM, Jones DB, Osterholm MT, MacDonald KL. An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. *J Infect Dis*. 1989;160:298–304.
- Widmer G, Dilo J, Tumwine JK, Tzipori S, Akiyoshi DE. Frequent occurrence of mixed *Enterocytozoon bieneusi* infections in humans. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:5357–5362.
- Widmer G, Köster PC, Carmena D. *Cryptosporidium hominis* infections in non-human animal species: revisiting the concept of host specificity. *Int J Parasitol*. 2020;50:253–262.
- Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JW. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol*. 2008;38:809–817.

- Wilson IW, Weedall GD, Lorenzi H, Howcroft T, Hon CC, Deloger M, Guillén N, Paterson S, Clark CG, Hall N. Genetic diversity and gene family expansions in members of the genus *Entamoeba*. *Genome Biol Evol.* 2019;11:688–705.
- Wittner M. Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. En Wittner M, Weiss LM (Eds.), *The Microsporidia and microsporidiosis*. Washington, WA, EEUU: Am Soc Microbiol; 1999:1–6.
- Wuerz T, Kane JB, Boggild AK, Kraiden S, Keystone JS, Fuksa M, Kain KC, Warren R, Kempston J, Anderson J. A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting. *Can J Gastroenterol.* 2012;26:729–733.
- Wumba R, Enache-Angoulvant A, Develoux M, Mulumba A, Mulumba PM, Hennequin C, Odio TW, Biligui S, Sala J, Thellier M. Prevalence of opportunistic digestive parasitic infections in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Results of a preliminary study in 50 AIDS patients. *Med Trop (Mars).* 2007;67:145–148.
- Wumba R, Jean M, Benjamin LM, Madone M, Fabien K, Josué Z, Jean S, Eric K, A C GO, Marc T. *Enterocytozoon bieneusi* identification using real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism in HIV-infected humans from Kinshasa province of the Democratic Republic of Congo. *J Parasitol Res.* 2012;2012:278028.
- Wumba R, Longo-Mbenza B, Mandina M, Odio WT, Biligui S, Sala J, Breton J, Thellier M. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite.* 2010;17:321–328.
- Wumba RD, Zanga J, Mbanzulu KM, Mandina MN, Kahindo AK, Aloni MN, Ekila MB. *Cryptosporidium* identification in HIV-infected humans. Experience from Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. *Acta Parasitol.* 2015;60:638–644.
- Xiao L, Feng Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food Waterborne Parasitol.* 2017;8–9:14–32.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010;124:80–89.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. Human amebiasis: Breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7:1105–1120.

- Yang X, Huang N, Jiang W, Wang X, Li N, Guo Y, Kváč M, Feng Y, Xiao L. Subtyping *Cryptosporidium ryanae*: A common pathogen in bovine animals. *Microorganisms*. 2020;8:E1107.
- Ye J, Xiao L, Ma J, Guo M, Liu L, Feng Y. Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1640–1643.
- Yee J, Dennis PP. The NADP-dependent glutamate dehydrogenase of *Giardia lamblia*: A study of function, gene structure and expression. *Syst Appl Microbiol*. 1993;16:759–767.
- Yimer M, Zenebe Y, Mulu W, Abera B, Saugar JM. Molecular prevalence of *Entamoeba histolytica/dispar* infection among patients attending four health centres in north-west Ethiopia. *Trop Doct*. 2017;47:11–15.
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res*. 2004;94:391–396.
- Zahedi A, Paparini A, Jian F, Robertson I, Ryan U. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2015;5:88–109.
- Zaki M, Zaman V, Sheikh NA. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to chlorine. *J Pak Med Assoc*. 1996;46:178–179.
- Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. *Parasitol Res*. 2007;101:43–51.
- Zhao W, Zhou H, Huang Y, Xu L, Rao L, Wang S, Wang W, Yi Y, Zhou X, Wu Y, Ma T, Wang G, Hu X, Peng R, Yin F, Lu G. *Cryptosporidium* spp. in wild rats (*Rattus* spp.) from the Hainan province, China: Molecular detection, species/genotype identification and implications for public health. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2019;9:317–321.
- Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Pathol*. 1967;48:495–501.
- Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J Parasitol*. 1995;81:127–129.
- Zinsstag J, Meisser A, Schelling E, Bonfoh B, Tanner M. From ‘two medicines’ to ‘One Health’ and beyond. *Onderstepoort J Vet Res*. 2012;79:492.
- Zintl A, Proctor AF, Read C, Dewaal T, Shanaghy N, Fanning S, Mulcahy G. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiol Infect*. 2009;137:270–277.





## **ANEXOS**



**Anexo I.** Familias de genotipos de *Cryptosporidium* spp. descritas en base a secuencias del gen de la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*).

Especie	Familias	Repetición de trinucleótidos (A, G, T)	Otras repeticiones (R)
<i>C. hominis</i>	Ia*, Ig, li, lj	TCA	AAGACGGTGGTAAGG
	Ib, le	TCA, TCG, TCT	
	Id, If*, Ih	TCA, TCG	AAGAAGGCCAAAGAAG
	Ik		
<i>C. parvum</i>	Ila*, Ilic, Ild, Iie, Iih, Iim, Ilo, Iir, Iis	TCA, TCG	ACATCA
	Iib, Iif, Iig, Iii, Iik, III, IIn, Iip, Iiq, Iit	TCA	–
<i>C. meleagridis</i>	IIIa, IIIb, IIIe, IIIf, IIIg	TCA, TCG	–
	IIIc, IIId, IIIh, IIIi, IIIj	TCA	–
<i>C. fayeri</i>	IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVf	TCA, TCG, TCT	–
<i>C. cuniculus</i>	Va, Vb	TCA	–
Genotipo caballo	VIa	TCA, TCG	–
	VIb, Vic	TCA	–
<i>C. wrairi</i>	VIIa	TCA, TCT	–
Genotipo hurón	VIIIa	TCA, TCG	–
<i>C. tyzzeri</i>	IXa*, IXb	TCA	ATTCTGGTACTGAAGATA
Genotipo visón	Xa	TCA, TCG	–
Genotipo zarigüeya	XIa	TCA, TCG, TCT	–
<i>C. ubiquitum</i>	XIIa, XIIb, XIIc, XIId, XIIe, XIIf.	–	–
<i>C. erinaci</i>	XIIIa	TCA	ACATCA
Genotipo ardilla	XIVa	TCA, TCG, TCT	–
<i>C. viatorum</i>	XVa	TCA	–
Genotipo mofeta	XVIa	TCA	–

Ia\*, If\*, Ila\*, IXa\* – presentan otras repeticiones adicionales. Fuente: [Xiao y Feng \(2017\)](#).

**Anexo II.** Prevalencia de *Giardia duodenalis* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

Pais	Población investigada	Método diagnóstico	Prevalencia (infectados/total)	Referencia
Angola	Pediátrica	MC	20,1 (66/328)	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
		PCR	37,9 (133/351)	Dacal <i>et al.</i> (2018)
Argelia	General con diarrea	MC	3,6 (38/1.042)	Benouis <i>et al.</i> (2013)
Botsuana	Pediátrica	ICT	7,3 (12/164)	Alexander <i>et al.</i> (2012)
Burkina Faso	General clínica	MC	43,5 (2.675/6.154)	Karou <i>et al.</i> (2011)
Camerún	General asintomática	ELISA	7,1 (14/197)	Richardson <i>et al.</i> (2011)
Chad	Adulta	MC	22,3 (55/247)	Korzeniewski (2012)
Costa de Marfil	General con diarrea	MC, ELISA, PCR	28,7 (39/136)	Becker <i>et al.</i> (2015)
Egipto	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	18,9 (224/1.187) 29,2 (47/161)	Ismail <i>et al.</i> (2016)
Etiopía	Pediátrica	MC, ELISA, PCR	55,0 (216/393)	de Lucio <i>et al.</i> (2016a)
Gana	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	1,0 (1/101) 37,9 (455/1.199)	Krumkamp <i>et al.</i> (2015)
Guinea-Bisáu	Pediátrica	MC, PCR	56,0 (28/50)	Ferreira <i>et al.</i> (2012)
	Pediátrica clínica	MC	33,9 (37/109)	Centeno-Lima <i>et al.</i> (2013)
Guinea Ecuatorial	Adulta (VIH+/VIH-)	MC, ELISA, PCR	14,2 (44/310) 4,2 (14/333)	Roka <i>et al.</i> (2012; 2013)
Kenia	Adulta	PCR	41,3 (329/796)	Easton <i>et al.</i> (2016)
Libia	Pediátrica	MC	28,8 (173/601)	Abdel-Magied y Elahwel (2006)
Madagascar	Pediátrica con/sin diarrea	MC	11,7 (314/2.692)	Randremanana <i>et al.</i> (2012)
Mali	Adulta	PCR	3,8 (2/53)	Frickmann <i>et al.</i> (2015)
Marruecos	Pediátrica	MC	12,5 (84/673)	El Fatni <i>et al.</i> (2014)
<b>Mozambique</b>	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>50,0 (115/232)</b>	<b>Nhamossa <i>et al.</i> (2015)</b>
	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>14,5 (10/69)</b>	<b>Acácio <i>et al.</i> (2019)</b>
	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>9,7 (95/983)</b>	<b>Bauhofer <i>et al.</i> (2020)</b>
	<b>Pacientes (TB, VIH+)</b>	<b>PCR</b>	<b>8,1 (8/99)</b>	<b>Irisarri-Gutiérrez <i>et al.</i> (2017)</b>

**Anexo II (continuación).** Prevalencia de *Giardia duodenalis* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Método diagnóstico	Prevalencia (infectados/total)	Referencia
Mozambique	Pediátrica (VIH+)	MC	6,5 (6/93)	Fonseca et al. (2014)
	General clínica	MC, PCR	37,0 (113/303)	Meurs et al. (2017)
	General clínica (VIH+)	MC	3,2 (12/371)	Cerveja et al. (2017)
	General clínica (VIH-)		0,7 (1/146)	
	Pediátrica clínica	MC	2,5 (13/529)	Mandomando et al. (2007)
Nigeria	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	37,2 (74/199)	Efunshile et al. (2015)
República Centroafricana	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	15,6 (27/173)	Bouyou-Akotet et al. (2016)
R.D. Congo	Adulta (VIH+)	MC, PCR	1,7 (3/175)	Wumba et al. (2010)
Ruanda	Pediátrica	MC, PCR	35,7 (222/622)	Heimer et al. (2015)
	Pediátrica	PCR	62,8 (366/583)	Ignatius et al. (2012)
Santo Tomé y Príncipe	Pediátrica con/sin diarrea	MC, PCR	8,3 (29/348)	Lobo et al. (2014)
			41,7 (185/444)	
Senegal	Adulta clínica	MC	10,5 (35/332)	Diongue et al. (2017)
Sudáfrica	General clínica (VIH+)	MC, ELISA, PCR, LAMP	11,9 (18/151)	Samie et al. (2014)
Sudan	Pediátrica con/sin diarrea	MC	10,1 (91/900)	Gabbad y Elawad (2014)
			33,4 (167/500)	
Tanzania	Pediátrica con/sin diarrea	ELISA, PCR	1,9 (5/270)	Moyo et al. (2011)
			62,2 (28/45)	
Túnez	Pediátrica con/sin diarrea	MC	1,5 (300/20.033)	Siala et al. (2015)
Uganda	Adulta	PCR	40,7 (44/108)	Johnston et al. (2010)
Zambia	Pediátrica	IF	29,0 (228/786)	Siwila et al. (2011)
Zimbabue	Población general	MC	2,7 (8/300)	Masungu et al. (2010)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; ICT: Inmunocromatografía; IF: Inmunofluorescencia; LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle; MC: Microscopía convencional; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; TB: Tuberculosis; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

**Anexo III.** Epidemiología molecular de *Giardia duodenalis* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Marcador genético	Assemblage (%)	Sub-assemblage	Referencia
Angola	Pediátrica	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i>	A (35,7), B (64,3)	Ai, Aii, Biii, Biv	Dacal et al. (2018)
Argelia	Pediátrica	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>tpi</i>	A (37,5), B (56,3), A+B (6,3)	Ai, Aii, Biii, Biv	Lalle et al. (2009)
Costa de Marfil	Pediátrica con diarrea	ssu rRNA, <i>bg</i>	A (34,4), B (59,0), A+B (6,6)	ND	Berrilli et al. (2012)
Egipto	General con diarrea	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i>	A (6,7), B (80,0), A+B (6,7), C (6,7)	Ai/Aii, Biii, B/Biii, Biv, Biii/Biv	Soliman et al. (2011)
	Pediátrica con/sin diarrea	<i>tpi</i>	E (100)	-	Abdel-Moein y Saeed (2016)
Etiopía	Pediátrica asintomática	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i>	A (52,2), B (22,0)	ND	Gelanew et al. (2007)
	Pacientes	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i>	B (100)	Biii, Biv	Flecha et al. (2015)
	Pediátrica	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i>	A (17,9), B (82,1)	Aii, Aiii/Aiii, Biii, Biv, Biii/Biv	de Lucio et al. (2016a)
Gana	Pediátrica	ssu rRNA, <i>gdh</i>	B (100)	Biii	Anim-Baidoo et al. (2016)
Guinea-Bisáu	Pediátrica	ssu rRNA y <i>bg</i>	A (11,5), B (84,6)	Aii	Ferreira et al. (2012)
Kenia	Pediátrica con diarrea	ssu rRNA, <i>gdh</i> , <i>bg</i> , <i>tpi</i>	A (1,4), B (88,9), A+B (9,7)	Aii, Biii, Biv, Biii/Biv	Mbae et al. (2016)
Marruecos	Pediátrica	ssu rRNA, <i>gdh</i>	A (18,1), B (81,8)	Aii, Biii, Biv	El Fatni et al. (2014)
<b>Mozambique</b>	<b>Pacientes (TB, VIH+)</b>	<b>ssu rRNA, <i>gdh</i></b>	<b>A (50,0), B (50,0)</b>	<b>Aii, Biv</b>	Irisarri-Gutiérrez et al. (2017)
Nigeria	General clínica	ssu rRNA, <i>tpi</i>	A (100)	Aii	Maiikai et al. (2012)
República Centroafricana	Adulta	ssu rRNA, <i>tpi</i>	A (100)	Aii	Sak et al. (2013)
Ruanda	Pediátrica	ssu rRNA, <i>tpi</i>	A (13,5), B (85,9), A+B (0,5)	Ai, Aii	Ignatius et al. (2012)
Santo Tomé y Príncipe	Pediátrica	ssu rRNA, <i>tpi</i>	A (55,5), B (45,5)	ND	Lobo et al. (2014)
Sudáfrica	General clínica	ssu rRNA, <i>tpi</i>	A (1,7), B (17,8), A+B (4,2)	ND	Samie et al. (2020)

**Anexo III (continuación).** Epidemiología molecular de *Giardia duodenalis* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Marcador genético	Assemblage (%)	Sub-assemblage	Referencia
Tanzania	Pediátrica	<i>ssu rRNA, gdh</i>	A (21,4), B (78,6)	All, BIII, BIV	Di Cristanziano et al. (2014)
	General clínica	<i>ssu rRNA</i>	A (6,7), B (88,8)	ND	Forsell et al. (2016)
Uganda	Pediátrica	<i>ssu rRNA, gdh, tpi</i>	A (ND), B (ND)	All, BIII, BIV	Johnston et al. (2010)
	Adulta	<i>ssu rRNA, gdh, tpi</i>	A (14,7), B (73,5), A+B (11,8)	All	Ankarklev et al. (2012a)

*bg*: Beta-giardina; *gdh*: Glutamato deshidrogenasa; ND: No determinado; *ssu rRNA*: ARN de la subunidad pequeña del ribosoma; TB: Tuberculosis; *tpi*: Triosa fosfato isomerasa; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

**Anexo IV.** Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

Pais	Población investigada	Método de diagnóstico	Prevalencia (infectados/total)	Referencia
Angola	Pediátrica con diarrea	MC	30,0 (101/337)	Gasparinho et al. (2016)
	Pediátrica	PCR	2,9 (10/351)	Dacal et al. (2018)
Argelia	General con diarrea	MC	0,1 (1/1.042)	Benouis et al. (2013)
Botsuana	Pediátrica con diarrea	NE	60,0 (45/75)	Creek et al. (2010)
Burkina Faso	Pacientes con diarrea	MC	26,5 (77/291)	Sangaré et al. (2015)
Camerún	General (VIH+/VIH-)	MC	14,4 (46/320)	Nkenfou et al. (2013)
Costa de Marfil	Adulta con diarrea	MC, ELISA, PCR	8,8 (12/136)	Becker et al. (2015)
Egipto	Adulta con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	5,9 (23/391), 56,5 (52/92)	Ibrahim et al. (2016)
Etiopía	Pediátrica, General (VIH+/VIH-)	MC, ELISA, PCR	8,5 (32/378) 26,9 (140/520)	Adamu et al. (2014)
	Pediátrica	PCR	4,6 (18/393)	de Lucio et al. (2016a)
Gana	Adulta (VIH+/VIH-)	MC	8,2 (34/413), 9,0 (72/800)	Boaitey et al. (2012)
Guinea Ecuatorial	General (VIH+/VIH-)	MC, ELISA, PCR	2,7 (9/333), 18,1 (31/171)	Blanco et al. (2014)
Kenia	Adulta clínica (VIH+)	ELISA, PCR	34,1 (56/164)	Wanyiri et al. (2014)
Libia	Adulta con diarrea	MC	2,1 (7/305)	Mergani et al. (2014)
Madagascar	Pediátrica	PCR	2,6 (7/265)	Greigert et al. (2018)
Mali	Adulta	PCR	5,7 (3/53)	Frickmann et al. (2015)
<b>Mozambique</b>	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>19,5 (84/431)</b>	<b>Nhampossa et al. (2015)</b>
	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>37,7 (26/69)</b>	<b>Acácio et al. (2019)</b>
	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>12,0 (118/985)</b>	<b>Bauhofer et al. (2020)</b>
	<b>Adultos con diarrea</b>	<b>MC, PCR</b>	<b>8,3 (9/108)</b>	<b>Casmo et al. (2018)</b>
	<b>Pacientes (TB, VIH+)</b>	<b>MC, PCR</b>	<b>8,1 (8/99)</b>	<b>Irisarri-Gutiérrez et al. (2017)</b>
Nigeria	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	1,0 (2/199), 46,8 (88/188)	Nassar et al. (2016)
República Centroafricana	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA, PCR	10,4 (18/173)	Bouyou-Akotet et al. (2016)
R.D. Congo	Adulta (VIH+)	MC, PCR	9,7 (17/175)	Wumba et al. (2010)

**Anexo IV (continuación).** Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Método de diagnóstico	Prevalencia (infectados/total)	Referencia
Santo Tomé y Príncipe	Pediátrica con/sin diarrea	MC, PCR	5,5 (19/348)	Lobo <i>et al.</i> (2014)
Senegal	Pediátrica con/sin diarrea	MC, ELISA	6,1 (23/375)	Faye <i>et al.</i> (2013)
Sudáfrica	Adulta (VIH+) Estudiantes voluntarios	ELISA	75,6 (146/193) 32,8 (19/59)	Bartelt <i>et al.</i> (2013)
Sudán	Pediátrica con/sin diarrea	MC	13,0 (115/866)	Sim <i>et al.</i> (2015)
Tanzania	Pediátrica con/sin diarrea	ELISA, PCR	10,4 (131/1.259), 18,9 (51/270)	Moyo <i>et al.</i> (2011)
Túnez	Pediátrica con/sin diarrea	MC	1,7 (7/403)	Rahmouni <i>et al.</i> (2014)
Uganda	General	PCR	32,4 (35/108)	Salyer <i>et al.</i> (2012)
Zambia	Pediátrica	IF	30,7 (241/786)	Siwila <i>et al.</i> (2011)
Zimbabue	General	MC	6,3 (19/300)	Masungu <i>et al.</i> (2010)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; IF: Inmunofluorescencia; MC: Microscopía convencional; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; TB: Tuberculosis; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

**Anexo V.** Epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Especies (%)	Familia	Subtipos ( <i>gp60</i> )	Referencia
Angola	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (70,0), <i>C. parvum</i> (20,0), <i>C. canis</i> (10,0)	ND	ND	Dacal <i>et al.</i> (2018)
Botsuana	Pediátrica con diarrea	<i>C. parvum</i> (50,0), <i>C. hominis</i> (41,0)	ND	ND	Creek <i>et al.</i> (2010)
Costa de Marfil	Adulta con diarrea	<i>C. meleagridis</i> (75,0), <i>C. parvum</i> (16,7), <i>C. hominis</i> (8,3)	ND	ND	Berrilli <i>et al.</i> (2012)
Egipto	Adulta	<i>C. hominis</i> (75,0), <i>C. parvum</i> (25,0)	Ild	IIdA20G1	Ibrahim <i>et al.</i> (2016)
	Pacientes con diarrea	<i>C. hominis</i> (66,7), <i>C. parvum</i> (66,7), <i>C. meleagridis</i> (5,6)	ND	ND	Eida <i>et al.</i> (2009)
	Pediátrica con diarrea	<i>C. hominis</i> (60,5), <i>C. parvum</i> (38,3), <i>C. parvum/C. bovis</i> (1,2)	Ila, Ild	IlaA15G1R1, IlaA15G2R1, IIdA20G1	Helmy <i>et al.</i> (2013)
Etiopía	General clínica con diarrea	<i>C. parvum</i> (95,1), <i>C. hominis</i> (2,4), <i>C. hominis/C. parvum</i> (2,4)	Ib, Ila	IlaA15G2R1b, IlaA16G2R1, IlaA16G1R1, IlaA9G3	Adamu <i>et al.</i> (2010)
	Pacientes (VIH+)	<i>C. parvum</i> (65,7), <i>C. hominis</i> (17,9), <i>C. viatorum</i> (7,1), <i>C. felis</i> (3,6), <i>C. meleagridis</i> (2,1), <i>C. canis</i> (1,4), <i>C. xiaoi</i> (1,4), <i>C. hominis/C. parvum</i> (0,7)	Ib, Id, Ie, If, Ila, Ilb, Ilc, Ild, Ile	IlaA13G2R1, IlaA14G2R1, IlaA15G2R1, IlaA16G2R1, IlaA16G3R1, IlaA17G2R1, IlaA18G2R1, IlaA19G1R, IlaA12, IlaA5G3a, IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA22G1, IIdA24G1, IlaA12G1, If-like, IbA10G2, IIdA20, IIdA24, IIdA26, IlaA11G3T3	Adamu <i>et al.</i> (2014)
	Pacientes	<i>C. hominis</i> (100)	Ib	IbA9G3	Flecha <i>et al.</i> (2015)
	General clínica	<i>C. viatorum</i> (90,0)	XVa	XVaA3d	Stensvold <i>et al.</i> (2015)
	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (11,1), <i>C. parvum</i> (5,6), <i>C. viatorum</i> (11,1)	ND	ND	de Lucio <i>et al.</i> (2016a)
Gana	Pediátrica con diarrea	<i>C. hominis</i> (58,0), <i>C. parvum</i> (42,1)	Ia, Ib, Id, Ie, Ilc, Ile	IaA15T1R3, IaA15G1R4, IaA17, IaA18R3, IaA19R3, IaA21R3, IaA22R3, IaA24R3, IbA13G3b, IIdA15, IeA11G3T3, IlcA5G3a, IlcA5G3b, IleA10G1, IleA10G2	Eibach <i>et al.</i> (2015)

**Anexo V (continuación).** Epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Especies (%)	Familia	Subtipos (gp60)	Referencia
Guinea Ecuatorial	Pacientes (VIH+)	<i>C. parvum</i> (54,8), <i>C. hominis</i> (50,0), <i>C. meleagridis</i> (3,2)	Ia, Ib, Id, Ilc, Ile	IlcA5G3, IleA10G1, IaA18R3, IaA24R3, IbA13G3, IdA15, IdA18	Blanco et al. (2014)
Kenia	ND	<i>C. hominis</i> (90,0), <i>C. meleagridis</i> (10,0)	Ib, Ie	ND	Peng et al. (2001)
	Pacientes (VIH+) con/sin diarrea	<i>C. hominis</i> (60,7), <i>C. parvum</i> (23,2), <i>C. canis</i> (7,1), <i>C. meleagridis</i> (5,3), <i>C. suis</i> (3,6)	Ia, Ib, Id, Ie, If, Ila, Ilb, Ile, Ilc	ND	Wanyiri et al. (2014)
	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (87,4), <i>C. parvum</i> (8,6), <i>C. felis</i> (1,1), <i>C. muris</i> (0,6), <i>C. canis</i> (1,7), <i>C. meleagridis</i> (0,6)	ND	ND	Gatei et al. (2006)
	Pediátrica (VIH+, VIH-)	<i>C. hominis</i> (82,8), <i>C. parvum</i> (11,9), <i>C. felis</i> (2,6), <i>C. meleagridis</i> (1,3), <i>C. parvum/C. hominis</i> (0,7)	Ia, Ib, Id, Ie, If	IaA25R, IaA27R3, IaA30R3, IaA7R1, IbA9G3, IbA9G3R2, IdA22, IdA24, IdA19, IdA25, IdA21, IdA20, IdA17G1, IdA18, IdA15G1, IdA23G1, IaA11G3T3R1, IaA11G3T3, IfA19G1, IfA14G1, IfA12G1	Mbae et al. (2015)
	Adulta	<i>C. viatorum</i> (ND)	XVa	XVaA3d	Stensvold et al. (2015)
Madagascar	Pediátrica con diarrea	<i>C. hominis</i> (91,7), <i>C. parvum</i> (8,3)	Ia, Id, Ie, Ilc	IaA22R3, IdA15G1, IaA11G3T3, IlcA5G3	Areeshi et al. (2008)
	Adulta	<i>C. suis</i> (100)	ND	ND	Bodager et al. (2015)
Malawi	Pediátrica (VIH+, VIH-)	<i>C. hominis</i> (95,3), <i>C. parvum</i> (4,7)	Ia, Ib, Id, Ie, Ilc, Ile	ND	Peng et al. (2003)
	Pediátrica con diarrea	<i>C. hominis</i> (58,1), <i>C. parvum</i> (23,3), <i>C. parvum/C. hominis</i> (2,3), <i>C. meleagridis</i> (4,7), <i>C. muris/C. andersoni</i> (2,3)	ND	ND	Morse et al. (2007)

**Anexo V (continuación).** Epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique..

País	Población investigada	Especies (%)	Familia	Subtipos (gp60)	Referencia
Mozambique	Pediátrica con diarrea	<i>C. hominis</i> (ND), <i>C. parvum</i> (ND)	IIc	IIcA5G3	Sow et al. (2016)
	Adulta con diarrea	<i>C. hominis</i> (37,5), <i>C. parvum</i> (37,5), <i>C. felis</i> (12,5), <i>C. hominis/C. parvum</i> (12,5)	Ia IIc	IaA23R3 IIcA5G3d	Casmo et al. (2018)
	Pacientes (TB, VIH+)	<i>C. hominis</i> (57,0)	Ile Ib, Id	IleA12G1 IbA10G2, IdA22	Irisarri-Gutiérrez et al. (2017)
Nigeria	Adulta (VIH+, VIH-)	<i>C. hominis</i> (47,2), <i>C. parvum</i> (44,4), <i>C. felis</i> (5,6), <i>C. canis</i> (2,8)	Ia, Ib, Ie, IIc	IaA14R3, IaA16R3, IaA24R3, IaA25R3, IbA13G3, IaA11T3G3, IIcA5G3a, IIcA5G3h, Nuevo subtipo familia 1, 2	Akinbo et al. (2010)
	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (44,2), <i>C. parvum</i> (32,5), <i>C. parvum/C. hominis</i> (5,2), <i>C. meleagridis</i> (6,5), <i>C. cuniculus</i> (6,5), <i>C. ubiquitum</i> (3,9), <i>C. canis</i> (1,3)	Ia, Ib, Id, Ie, Ih, Ila, Ilic, Ili, IIIm	IaA18R2, IaA22R2, IaA24R2, IaA25R2, IaA28R2, IaA21R1, IbA10G2, IbA13G3, IdA11, IdA17, IaA11G3T3, IhA14G1, IlaA15G2R1, IIaA16G1R1, IIcA5G3a, IIcA5G3b, IIIA11, IImA14G1	Molloy et al. (2010)
R.D. del Congo	Pacientes (VIH+)	<i>C. hominis</i> (50,0), <i>C. parvum</i> (25,0)	Ie, IIc	IeA11G3T3, IIcA5G3k	Ojuromi et al. (2016)
	Pediátrica con/sin diarrea	<i>C. hominis</i> (60,0), <i>C. parvum</i> (40,0)	Ia, IIc	IaA24R3, IbA13G3, IIcA5G3k	Ayinmode et al. (2012)
	General clínica	<i>C. hominis</i> (66.7), <i>C. parvum</i> (33.3)	Ia, Ile	IaA23R3, IaA25R3, IleA10G1	Maikai et al. (2012)
Santo Tomé y Príncipe	Adulta (VIH+)	<i>C. hominis</i> (80,0), <i>C. parvum</i> (20,0)	ND	ND	Wumba et al. (2015)
Sudáfrica	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (73,7), <i>C. parvum</i> (26,3)	Ia, Ie, Ila, Ild	IeA11G3T3R1, IaA11G3T3, IaA27R3, IaA23R3, IldA21G1a, IldA26G1, IIaA16G2R1, IIaA15G2R1	Lobo et al. (2014)
	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (75,0), <i>C. meleagridis</i> (25,0)	Ib, Ie	IbA12G3R2, IbA10G2, IeA11G3T3	Samra et al. (2016)

**Anexo V (continuación).** Epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

Pais	Población investigada	Especies (%)	Familia	Subtipos ( <i>gp60</i> )	Referencia
Sudáfrica	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (76,0), <i>C. parvum</i> (20,0), <i>C. meleagridis</i> (4,0)	la, lb, ld, le, lf, llb, llc, lle, llld	laA20R3, laA25G1R3, laA17R3, laA9G3, laA10G1, ldA20, ldA25ldA26, ldA24, leA11G3T3, lfA14G1, lfA12G1, llbA11, llcA5G3b, lleA12G1, llldA4	Abu Samra <i>et al.</i> (2013)
			la, lb, ld, le, llc	ND	Leav <i>et al.</i> (2002)
Tanzania	Adulta	<i>C. hominis</i> (100)	lf	lfA12G2	Parsons <i>et al.</i> (2015)
Túnez	Adulta clínica (VIH+)	<i>C. hominis</i> (71,4), <i>C. parvum</i> (28,6)	ND	ND	Houpt <i>et al.</i> (2005)
	Pediátrica	<i>C. parvum</i> (57,1), <i>C. meleagridis</i> (42,9)	lla, lld	llaA15G2R1b, lldA16G1	Rahmouni <i>et al.</i> (2014)
Uganda	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (40,0), <i>C. parvum</i> (20,0), <i>C. meleagridis</i> (20,0), <i>C. hominis/C. meleagridis</i> (20,0)	ND	ND	Abda <i>et al.</i> (2011)
	Pediátrica	<i>C. hominis</i> (74,4), <i>C. parvum</i> (18,3), <i>C. hominis/C. parvum</i> (3,7), <i>C. meleagridis</i> (3,7)	la, lb, ld, le, llc, llg, llh, lli	ND	Akiyoshi <i>et al.</i> (2006)
		General	<i>C. parvum</i> (80,0), <i>C. hominis</i> (20,0)	ND	ND

**Anexo VI.** Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

Pais	Poblacion investigada	Método de diagnóstico	<i>E. histolytica</i> y/o <i>dispar</i> (%)	<i>E. histolytica</i> (%)	<i>E. dispar</i> (%)	Referencia
Angola	Pediátrica	PCR	-	0,3 (1/328)	13,1 (43/328)	Oliveira et al. (2015)
Burkina Faso	Pediátrica	MC	66,5 (256/385)	-	-	Erismann et al. (2016)
Chad	Rural (madres/hijos)	MC	20,9 (71/340)	-	-	Bechir et al. (2012)
Camerún	General (VIH+)	MC	-	15,9 (33/207)	-	Vouking et al. (2014)
Costa de Marfil	General con diarrea	MC	3,7 (5/136)	-	-	Becker et al. (2015)
Egipto	General con diarrea	MC	22,2 (43/194)	-	-	Ibrahim et al. (2014)
Etiopía	General con diarrea	ELISA	-	38,1 (32/84)	-	Abd-Alla et al. (2002)
	General con diarrea	MC, PCR	-	1,7 (7/422)	42,2 (178/422)	Yimer et al. (2016)
	Estudiantes	MC	19,7 (95/483)	-	-	Ayele et al. (2019)
	Embarazadas	MC	-	3,4 (12/349)	-	Bolka et al. (2019)
	Reclusos	MC	48,8 (59/121)	-	-	Mamo (2014)
	Granjeros	MC	51,7 (59/115)	-	-	
Gana	General rural	MC, PCR	39,8 (98/246)	0,5 (1/192)	37,5 (72/192)	Verweij et al. (2003)
Guinea Bisau	Pediátrica con diarrea	MC	17,3 (98/566)	-	-	von Huth et al. (2019)
Libia	General con/sin diarrea	MC	46,1(323/700) 16,3 (98/601)	-	-	Ghengesh et al. (2016)
Kenia	General con diarrea	MC	-	10,2 (29/284)	-	Njuguna et al. (2016)
Madagascar	General rural	MC	30,1 (636/2113)	-	-	de Glanville et al. (2018)
	General con/sin diarrea	PCR	-	4,5 (12/265)	5,3 (14/265)	Greigert et al. (2018)
Mali	Pediátrica	MC, PCR	-	-	3,6 (2/56)	Fofana et al. (2019)
Marruecos		MC	47,0 (2.016/4.285)	-	-	El Guamri et al., 2009
<b>Mozambique</b>	<b>Pediátrica</b>	<b>MC</b>	-	<b>31,2 (25.999/83.331)</b>	-	Augusto et al. (2009)
	<b>Pacientes (TB, VIH+)</b>	<b>PCR</b>	<b>6,1 (6/99)</b>	-	<b>5,1 (5/99)</b>	Irisarri-Gutiérrez et al. (2017)
	<b>Pediátrica con diarrea</b>	<b>ELISA</b>	<b>12,1 (28/232)</b>	-	-	Nhampossa et al. (2015)

**Anexo VI (continuación).** Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Método de diagnóstico	<i>E. histolytica</i> y/o <i>dispar</i> (%)	<i>E. histolytica</i> (%)	<i>E. dispar</i> (%)	Referencia
Mozambique	Pediátrica con diarrea	ELISA	-	2,0 (20/1004)	-	Bauhofer et al. (2020)
	Pediátrica clínica	MC	-	0,4 (2/529)	-	Mandomando et al. (2007)
	General asintomática	MC, PCR	9,9 (30/303)	10,0 (3/30)	-	Meurs et al. (2017)
	General (VIH+/VIH-)	MC	-	1,7 (9/517)	-	Cerveja et al. (2018)
	Pediátrica con diarrea	ELISA	-	13,0 (9/69)	-	Acácio et al. (2019)
Nigeria	Pediátrica	ELISA, PCR	-	-	18,6 (37/199)	Efunshile et al. (2015)
	Pediátrica	MC	25,3 (97/384)	-	-	Gyang et al. (2017)
República Centroafricana	General (VIH+/VIH-)	MC	-	8,4 (20/238)	-	Obateru et al. (2017)
	Pediátrica	MC	-	14,7 (15/102)	-	Tékpa et al. (2018)
Ruanda	Pediátrica	PCR	-	1,0 (6/583)	14,7 (86/583)	Ignatius et al. (2012)
	Pediátrica	MC	-	26,1 (92/353)	-	Butera et al. (2019)
Santo Tomé y Príncipe	Pediátrica	MC, ELISA	0,7 (3/444)	0,2 (1/444)	-	Ferreira et al. (2015)
Senegal	General clínica	MC	16,9 (56/332)	-	-	Diougue et al. (2017)
Sudáfrica	General (VIH+/VIH-)	MC	-	7,3 (21/288); 5,8 (16/276)	-	Gassama et al. (2001)
	Clínica con diarrea	PCR	26,7 (129/484),	8,5 (41/484)	7,9 (38/484)	Ngobeni et al. (2017)
Sudán	General (VIH+)	MC	26,5 (40/151)	-	-	Samie et al. (2014)
	General (VIH+)	ELISA	-	34,0 (127/374)	-	Samie et al. (2010)
Tanzania	Pediátrica	MC	-	3,6 (18/500)	-	Gabbad et al. (2014)
	Trasplante renal	MC	7,5 (45/600)	-	-	Mohamed et al. (2018)
Túnez	General con/sin diarrea	MC, PCR	-	0,6 (1/174)	5,7 (10/174)	Forsell et al. (2016)
Uganda	Pediátrica con/sin diarrea	MC	0,5 (102/20.033)	-	-	Siala et al. (2015)
	General (VIH+)	MC	-	1,4 (7/484)	-	Brink et al. (2002)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; MC: Microscopía convencional; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; TB: Tuberculosis;

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

**Anexo VII.** Prevalencia de *Blastocystis* sp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Método de diagnóstico	Prevalencia (infectados/total)	Referencia
Angola	Pediátrica	PCR	25,6 (90/351)	Dacal <i>et al.</i> (2018)
Costa de Marfil	General	PCR	58,2 (64/110)	D'Alfonso <i>et al.</i> (2017)
Egipto	Clinica con diarrea	MC, PCR	95,0 (19/20)	Souppart <i>et al.</i> (2010)
Liberia	Clinica (IBS)	MC, PCR	81,8 (90/110)	Fouad <i>et al.</i> (2011)
Liberia	Pediátrica	PCR	69,8 (30/43)	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Libia	Clinica	PCR	28,0 (42/150)	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Madagascar	Clinica con/sin diarrea	MC, PCR	69,8 (185/265)	Greigert <i>et al.</i> (2018)
Mozambique	Pediátrica	MC	21,0 (32/150)	Guidetti <i>et al.</i> (2011)
	General asintomática	MC, PCR	20,9 (63/302)	Meurs <i>et al.</i> (2017)
	Pacientes (TB, VIH+)	MC	13,1 (13/99)	Irisarri-Gutiérrez <i>et al.</i> (2017)
Nigeria	Clinica	PCR	48,9 (23/47)	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Senegal	Pediátrica con/sin diarrea	PCR	100 (93/93)	El Safadi <i>et al.</i> (2014)
Tanzania	Clinica con/sin diarrea	MC, PCR	60,9 (106/174)	Forsell <i>et al.</i> (2016)
Tunisia	Manipuladores de alimentos	MC, PCR	16,2 (85/524)	Ben Abda <i>et al.</i> (2017)

IBS: Síndrome de colon irritable; MC: Microscopía convencional; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

**Anexo VIII.** Epidemiología molecular de *Blastocystis* sp. en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país.

País	No. de aislados	Diversidad y frecuencia de subtipos (número/%)											Referencia
		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9			
Angola	75	23 (30,7)	23 (30,7)	27 (36,0)	-	1 (1,3)	-	1 (1,3)	-	-	-	-	Dacal <i>et al.</i> (2018)
Costa de Marfil	110	55 (50,0)	24 (21,8)	31 (28,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	D'Alfonso <i>et al.</i> (2017)
Egipto	44	8 (18,2)	-	24 (54,5)	-	-	8 (18,2)	4 (9,1)	-	-	-	-	Hussein <i>et al.</i> (2008)
	19	3 (15,8)	4 (20,1)	12 (63,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	Souppart <i>et al.</i> (2010)
	90	15 (16,7)	-	39 (43,3)	-	-	23 (25,6)	13 (14,4)	-	-	-	-	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Liberia	25	7 (28,0)	7 (28,0)	8 (32,0)	3 (12,0)	-	-	-	-	-	-	-	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Libia	38	19 (50,0)	3 (7,9)	15 (39,5)	-	-	-	1 (2,6)	-	-	-	-	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
Madagascar	171	80 (46,8)	36 (21,1)	42 (24,6)	-	-	-	-	-	-	-	-	Greigert <i>et al.</i> (2018)
Nigeria	22	10 (45,5)	-	9 (40,9)	3 (13,6)	-	-	-	-	-	-	-	Alfellani <i>et al.</i> (2013a)
	127	51 (40,2)	42 (33,1)	33 (26,0)	-	-	-	1 (0,8)	-	-	-	-	Poulsen <i>et al.</i> (2016)
Senegal	93	26 (28,2)	19 (20,4)	46 (49,5)	2 (1,9)	-	-	-	-	-	-	-	El Safadi <i>et al.</i> (2014)
Tanzania	92	36 (34,0)	28 (26,4)	27 (25,5)	-	-	-	1 (0,9)	-	-	-	-	Forsell <i>et al.</i> (2016)
Túnez	61	18 (29,5)	10 (16,4)	31 (50,8)	1 (1,6)	-	-	1 (1,6)	-	-	-	-	Ben Abda <i>et al.</i> (2017)

**Anexo IX.** Prevalencia y diversidad molecular de *Enterocytozoon bieneusi* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Síntomas	Método de diagnóstico	Prevalencia (Infectados/total)	Genotipo (No. aislados)	Referencia
Camerún	General clínica (VIH+/TB)	Diarrea	MC, IF	35,7 (10/28)	ND	Nkinin <i>et al.</i> (2007)
	General clínica (VIH-/TB)			24,0 (6/25)		
	General			67,5 (85/126)		
	General clínica (VIH+)	NE	IF, PCR	0,5 (4/758)	A (8), B (3), CAF4 (5), D (3), Type IV (1)	Bretton <i>et al.</i> (2007)
	General clínica (VIH-)			2,9 (22/758)	Type IV (1)	
	Adulta (VIH+) con diarrea	Diarrea	MC, PCR	6,5 (3/46)	Type IV (4)	Sarfati <i>et al.</i> (2006)
	Adulta (VIH-) sin diarrea			4,6 (5/108)		
	General (VIH-)	Asintomática	PCR	2,6 (5/196)	CAF1 (1), Type IV (4)	Ndizi <i>et al.</i> (2016)
Chad	Adulta clínica (VIH+) <sup>a</sup>	Diarrea	MC, IF, PCR	100 (1/1)	ND	Raccurt <i>et al.</i> (2008)
Etiopía	Adulta (VIH+/VIH-)	Diarrea	U2B, PCR	14,3 (15/105)	ND	Endeshaw <i>et al.</i> (2005)
	Adulta (VIH+/VIH-)	Diarrea, otros	MC, PCR	12,3 (30/243)	ND	Endeshaw <i>et al.</i> (2006)
Gabón	Adulta (VIH+)	Diarrea	IF, PCR	3,0 (25/822)	A (1), CAF1 (3), CAF2 (1), CAF3 (1), CAF4 (4), D (1), Type IV (4)	Bretton <i>et al.</i> (2007)
Kenia	Adulta (VIH+)	Diarrea	U2B	3,0 (1/36)	ND	Mwachari <i>et al.</i> (1998)
Madagascar	Adulta clínica	Diarrea	PCR	1,5 (1/67)	ND	Greigert <i>et al.</i> (2018)
		Asintomática		2,5 (5/198)		
Malawi	General clínica (VIH+/VIH-)	NE	PCR	100 (37/37)	D (4), Type IV (9), Peru8 (1), S1 (1), S2 (11), S3 (2), S4 (1), S5 (4), S6 (2), UG2145(1)	Ten Hove <i>et al.</i> (2009)
	Pediátrica (VIH+)	Diarrea, otros	PCR	37,0 (13/35)	ND	Huibers <i>et al.</i> (2018)
Mali	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	MC, ME	32,0 (28/88)	ND	Maiga <i>et al.</i> (1997)
	Adulta clínica (VIH-)			27,0 (3/11)		
	Pediátrica (VIH+)	Diarrea	U2B, IF, PCR	14,8 (9/61)	ND	Alfa Cisse <i>et al.</i> (2002)
	Pediátrica (VIH-)			0,0 (0/71)		
<b>Mozambique</b>	<b>General</b>	<b>Asintomática</b>	<b>PCR</b>	<b>9,0 (27/301)</b>	<b>ND</b>	<b>Meurs <i>et al.</i> (2017)</b>
Níger	Adulta (VIH+)	Diarrea, otros	MC, ME	7,0 (4/60)	ND	Bretagne <i>et al.</i> (1993)
	Pediátrica			0,8 (8/990)		
	General (VIH+)	NE	MC, PCR	10,5 (24/228)	A (10), CAF1 (2), D (2), E (1), HAN1 (1), Type IV (1), NIA1 (3)	Espern <i>et al.</i> (2007)
Nigeria	Adulta	NE	MC	39,6 (80/204)	ND	Ikeh <i>et al.</i> (2007)

**Anexo IX (continuación).** Prevalencia y diversidad molecular de *Enterocytozoon bieneusi* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Síntomas	Método de diagnóstico	Prevalencia (Infectados/total)	Genotipo (No. aislados)	Referencia
Nigeria	Pediátrica (VIH-)	Con/sin diarrea	PCR	9,3 (4/43)	D (2), Type IV (1), K-like (1)	Ayinmode <i>et al.</i> (2011)
	General clínica (VIH+/VIH-)	Diarrea, otros	PCR	6,4 (10/157)	A/Type IV (1), D (3), D/WL7 (1), Type IV (1), WL7 (3), WL7/Type IV (1)	Maikai <i>et al.</i> (2012)
	General clínica (VIH+)	Con/sin diarrea	MC, IF, PCR	2,6 (5/193)	B (1), P-like, Peru3, PEb IV, PEbV, Type IV, UG2145 (2)	Ojuromi <i>et al.</i> (2012)
	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea Sin diarrea	PCR	26,5 (26/98) 4,3 (52/365)	A (22), CAF2 (2), D (31), D/Type IV (1), EbpA (1), Type IV (14), Nig1 (1), Nig2 (1), Nig3 (1), Nig4(1), Nig5 (1), Peru 8 (1)	Akinbo <i>et al.</i> (2012)
	General clínica (VIH+)	Diarrea	PCR	7,7 (10/132)	D (1), Nig2 (2), Peru8 (1), Nig4-like (1), Type IV (5)	Ayinmode <i>et al.</i> (2014)
	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea Sin diarrea	PCR	11,1 (12/108) 3,4 (6/177)	Co infección (3), Nig4 (2), Nig6 (10), Nig7 (2), Type IV (1)	Akinbo <i>et al.</i> (2013)
R.D. Congo	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	PCR	5,5 (5/90)	Type IV (4), coinfección (1)	Ojuromi <i>et al.</i> (2016)
	Adulta (VIH+)	Diarrea	IF, PCR	5,1 (9/175)	NIA1 (2)	Wumba <i>et al.</i> (2010)
	Adulta (VIH+)	Diarrea	MC, IF	2,0 (1/50)	ND	Wumba <i>et al.</i> (2007)
Santo Tomé y Príncipe	Pediátrica Pediátrica clínica	Diarrea, otros	PCR	5,2 (7/134) 8,9 (19/214)	CAF1 (2), KIN-3 (1), Type IV (4), A (2), D (5), CAF1 (2), Type IV (10)	Lobo <i>et al.</i> (2014)
	General clínica Pediátrica	Diarrea	MC, PCR	12,9 (33/322) 4,5 (3/322)	ND	Samie <i>et al.</i> (2007)
Tanzania	Adulta clínica (VIH+) Pediátrica clínica (VIH+/VIH-)	Diarrea, fiebre	MC, ME	3,5 (3/86) 3,4 (2/59)	ND	Cegielski <i>et al.</i> (1999)
	General clínica	Diarrea	MC, PCR	3,5 (3/86)	ND	Chabchoub <i>et al.</i> (2009)
	Pediátrica clínica (VIH+)	Asintomática	MC, PCR	100 (1/1)	ND	Abdelmalek <i>et al.</i> (2011)
	Adulta clínica (VIH+) Adulta clínica (VIH-)	Diarrea, otros	MC, PCR	20,0 (7/35) 5,4 (3/56)	ND	Anane <i>et al.</i> (2011)

**Anexo IX (continuación).** Prevalencia y diversidad molecular de *Enterocytozoon bieneusi* en África. Se indican datos obtenidos de estudios representativos por país, incluido Mozambique.

País	Población investigada	Síntomas	Método de diagnóstico	Prevalencia (Infectados/total)	Genotipo (No. aislados)	Referencia
Túnez	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	MC PCR	2,5 (3/119) 5,9 (7/119)	ND	Chabchoub <i>et al.</i> (2012a)
	Adulta clínica (VIH+) Pediátrica clínica (VIH+)	Diarrea	MC, PCR	100 (7/7)	B (2), D (4), Peru8 (1)	Chabchoub <i>et al.</i> (2012b)
	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea Asintomática	MC, PCR	19,4 (6/31) 2,8 (2/71)	ND	Aissa <i>et al.</i> (2017)
Uganda y Zambia	Adulta clínica (VIH+) <sup>b</sup>	Diarrea	MC, ME	6,5 (5/77)	ND	Lucas <i>et al.</i> (1989)
	Pediátrica clínica	Diarrea	MC, PCR	17,4 (310/1.779) 16,8 (112/667)	Type IV (6), UG2145 (1)	Tumwine <i>et al.</i> (2002)
	Pediátrica clínica (VIH+)	Sin diarrea	PCR	76,9 (70/91)	ND	Tumwine <i>et al.</i> (2005)
	Pediátrica clínica (VIH-)	Diarrea	PCR	6,6 (10/152)	ND	Hautvast <i>et al.</i> (1997)
Zambia	Pediátrica	Asintomática	U2B, ME	0,6 (1/176)	ND	Hautvast <i>et al.</i> (1997)
Zimbabue	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	MC	10,0 (13/129)	ND	Van Gool <i>et al.</i> (1995)
	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	MC, PCR	46,0 (34/74)	ND	Carville <i>et al.</i> (1997)
	Adulta clínica (VIH+)	Diarrea	MC PCR	18,0 (10/55) 51,0 (28/55)	ND	Gumbo <i>et al.</i> (1999)
	General clínica (VIH-)	Diarrea, otros	MC, PCR	33,0 (2/6)	ND	Gumbo <i>et al.</i> (2000)

IF: inmunofluorescencia; MC: microscopía convencional; ME: microscopía electrónica; ND: no determinado; NE: no especificado; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TB: tuberculosis; U2B: *uvitex 2B fluorescent dye*; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

<sup>a</sup>Paciente procedente del Chad y diagnosticada en Francia

<sup>b</sup>Diagnosticado en una biopsia intestinal

**Anexo X. Cuestionario epidemiológico usado en la población pediátrica estudiada en España.****CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO**

El carácter de este cuestionario es estrictamente anónimo y voluntario. Los datos proporcionados serán utilizados únicamente para fines sanitarios.

Responda a las preguntas con la ayuda de los padres de la forma más honesta y sincera posible. Entregar junto con la muestra de heces, asegurándose que el número de referencia conste en ambos

Número de referencia:		
Fecha: / /		
Nombre de la persona que cumplimenta el cuestionario:		
Teléfono o e-mail de contacto:		
Domicilio:		
Municipio:	País Nacimiento:	Fecha llegada España* / / <small>* para nacidos fuera de España</small>

**DATOS DEL NIÑO/A PARTICIPANTE EN ESTE ESTUDIO**

Nombre:
Sexo:
Edad:
¿Ha tenido tu hijo/a diarrea en los últimos 7 días? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no
Número de hermanos (excluido el participante):

**DATOS DE CONTACTO CON PERSONAS**

¿Niños pequeños (<3 años) que acuden a guardería? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no
¿Has tenido contacto con algún miembro de la familia con diarrea en el último mes? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no
¿Ha habido en el aula de tu hijo/a casos de diarrea en el último mes? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no sabe

**FACTORES AMBIENTALES**

¿Ha viajado algún miembro de la familia al extranjero en los últimos 6 meses? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no
Lugares visitados :
¿Contacto habitual directo con perros en casa? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no ¿Contacto habitual directo con gatos en casa? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no ¿Ha presentado diarrea alguno de estos animales en los últimos 6 meses? <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> no sabe/no recuerda
¿De donde procede el agua que consumes habitualmente? <input type="checkbox"/> Red Pública <input type="checkbox"/> Embotellada <input type="checkbox"/> Fuentes o manantiales ¿Has bebido agua que no proceda de red pública o embotellada? <input type="checkbox"/> sí Especificar: <input type="checkbox"/> no
Prácticas algún deporte acuático (piscina, piragüismo..) <input type="checkbox"/> sí Especificar <input type="checkbox"/> no

**PRÁCTICAS DE HIGIENE**

Lavado de manos antes de las comida: <input type="checkbox"/> siempre <input type="checkbox"/> habitualmente <input type="checkbox"/> rara vez <input type="checkbox"/> nunca
Lavado de vegetales, frutas, hortalizas <input type="checkbox"/> siempre <input type="checkbox"/> habitualmente <input type="checkbox"/> rara vez <input type="checkbox"/> nunca

**Anexo XI.** Cuestionario epidemiológico usado en la población pediátrica estudiada en Mozambique.

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Estimado pai e/ou representante do menor!

Bom dia/Boa tarde

Chamo-me .....(nome do questionante). Sou..... (sua ocupação) e quero solicitar-vos a responder, dentro de cinco minutos, algumas perguntas relacionadas com a criança que representa. As perguntas dizem sobre um estudo relacionado com parasitas intestinais. O carácter deste questionário é estritamente anónimo e voluntário. Os dados fornecidos serão utilizados apenas para fins académicos.

A.Dados de identificação			
Nr. de referência -----			
Nr. de identificação do doente (só se for na Unidade Sanitária) -----			Data de colecta ----/----/2017
Provincia-----	Distrito -----	Unidade Sanitária -----	Escolinha/Escola ----- Rural <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/>
Nome da criança -----		Idade -----	Sexo: masculino <input type="checkbox"/> feminino <input type="checkbox"/>
Domicílio:			
B.Caracterização sócio-demográfica			
Pessoas que integram a unidade familiar e participam neste estudo			
Nome	Parentesco/ Relação	Sexo	Idade
1.Dados de contacto com pessoas			
Crianças que frequentam creches? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Já teve contacto com um membro da família com diarreia na última semana? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Houve na sala de aula do seu filho /a casos de diarreia nos últimos 7 dias? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe			
2.Factores ambientais			
Tipo de alojamento: <input type="checkbox"/> alvenaria <input type="checkbox"/> casa de madeira <input type="checkbox"/> casa de areia <input type="checkbox"/> Outro -----			
Contacto habitual directo com animais domésticos (vacas, ovelhas..)? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não. Especificar:			
Contacto habitual directo com cães/gatos em casa? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Especificar:			
Algum animal com diarreia nos últimos 7 dias? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe/não recorda			
De onde vem a água que geralmente consomem? <input type="checkbox"/> torneira <input type="checkbox"/> poço <input type="checkbox"/> Fontes ou nascentes			
Já bebeu água de outras fontes? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não. Especificar:			
Tratamento da água para beber: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não. Especificar:			
3.Práticas de higiene			
Lava as mãos antes das refeições: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> habitualmente <input type="checkbox"/> rara vez <input type="checkbox"/> nunca			
Lava vegetais, frutas, legumes: <input type="checkbox"/> sempre <input type="checkbox"/> habitualmente <input type="checkbox"/> raras vezes <input type="checkbox"/> nunca			
Hábito de defecar: latrinas <input type="checkbox"/> céu aberto <input type="checkbox"/>			
Lixo no quintal: removido sempre <input type="checkbox"/> exposto <input type="checkbox"/>			
C.Dados clínicos relacionados à provável infecção parasitária intestinal (só para crianças sintomáticas)			
Dor de barriga e cólicas <input type="checkbox"/> falta de apetite <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> gases <input type="checkbox"/> indisposição <input type="checkbox"/>			
vômitos <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> náuseas <input type="checkbox"/> fraqueza <input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> comichão anal <input type="checkbox"/> cefaléia <input type="checkbox"/> obstipação intestinal <input type="checkbox"/> manchas na pele <input type="checkbox"/> Outros (mencionar):			

**Anexo XII.** Oligonucleótidos (incluyendo sondas y cebadores) utilizados para la detección y/o caracterización molecular de las especies de protistas entéricos investigadas en el presente estudio.

Especie de protista	Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5'–3')	Referencia
<i>Giardia duodenalis</i>	<i>ssu</i> rRNA	Sonda	FAM–CCGGGGGGTCCCTGCTAG-BHQ1	Verweij <i>et al.</i> (2003b)
		Gd-80F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	Verweij <i>et al.</i> (2003b)
		Gd-127R	TTGCCAGCGGTGCCG	Verweij <i>et al.</i> (2003b)
	<i>gdh</i>	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGYTCCGT	Read <i>et al.</i> (2004)
		GDHiF	CAGTACACCTCYGCTCTCGG	Read <i>et al.</i> (2004)
		GDHiR	GTRTCTTGACATCTCC	Read <i>et al.</i> (2004)
	<i>bg</i>	G7_F	AAGCCCGACGACCTCACCCGCGTGC	Lalle <i>et al.</i> (2005)
		G759_R	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	Lalle <i>et al.</i> (2005)
		G99_F	GAACGAAACGAGATCGAGGTCCG	Lalle <i>et al.</i> (2005)
		G609_R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	Lalle <i>et al.</i> (2005)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>tpi</i>	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTGC	Sulaiman <i>et al.</i> (2003)
		AL3546	CAAACCTTTCGCAAAACC	Sulaiman <i>et al.</i> (2003)
		AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACCT	Sulaiman <i>et al.</i> (2003)
		AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC	Sulaiman <i>et al.</i> (2003)
	<i>ssu</i> rRNA	CR-P1	CAGGGAGGTAGTGACAAGAA	Tiangtip y Jongwutiwes (2002)
	CR-P2	TCAGCCTTGCACCATACTC	Tiangtip y Jongwutiwes (2002)	
	CR-P3	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	Tiangtip y Jongwutiwes (2002)	
<i>Cryptosporidium hominis/parvum</i>	<i>gp60</i>	CPB-DIAGR	TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	Tiangtip y Jongwutiwes (2002)
		AL-3531	ATAGTCTCCGCTGTATTC	Feltus <i>et al.</i> (2006)
		AL-3535	GGAAGGAACGATGTATCT	Feltus <i>et al.</i> (2006)
		AL-3532	TCCGCTGTATTCTCAGCC	Feltus <i>et al.</i> (2006)
		AL-3534	GCAGAGGAACCAGCATC	Feltus <i>et al.</i> (2006)
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	<i>gp60</i>	CviatF2	TTCATTCTGACCCCTTCATAG	Stensvold <i>et al.</i> (2015)
	<i>gp60</i>	CviatR5	GTCTCTGAATCTCTGCTTACTC	Stensvold <i>et al.</i> (2015)

**Anexo XII (continuación).** Oligonucleótidos (incluyendo sondas y cebadores) utilizados para la detección y/o caracterización molecular de las especies de protistas entéricos investigadas en el presente estudio.

Especie de protista	Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5' -3')	Referencia
<i>Cryptosporidium parvum</i>	gp60	CviatF3	GAGATTGTCACATCATCGTAC	Stensvold et al. (2015)
	gp60	CviatR8	CTACACGTAAATAATTCGCGAC	Stensvold et al. (2015)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>		Sonda Eh	FAM-TCATTGAATGAATTGGCCATT-MGB	Gutiérrez-Cisneros et al. (2010)
		Sonda Ed	VIC-TTACTTACATAAAATGGCCACTTTGMGB	Gutiérrez-Cisneros et al. (2010)
		Ehd-239F	ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA	Verweij et al. (2003a)
<i>Blastocystis</i> spp.		Ehd-88R	GCGGACGGCTCATTATAACA	Verweij et al. (2003a)
	ssu rRNA	BhRDr	GAGCTTTTAACTGCAACAACG	Scicluna et al. (2006)
		RD5	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	Scicluna et al. (2006)
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	ITS/ssu rRNA	EBITS3	GGTCATAGGGATGAAGAG	Buckholt et al. (2002)
		EBITS4	TTCGAGTTCTTTCGCGCTC	Buckholt et al. (2002)
		EBITS1	GCTCTGAATATCTATGGCT	Buckholt et al. (2002)
		EBITS2.4	ATCGCCGACGGATCCAAGTG	Buckholt et al. (2002)

bg: Beta-giardina; BHO1: Apagador de agujero negro 1 (*Black Hole Quencher*); FAM: 6-Carboxifluoresceína; *gdh*: Glutamato deshidrogenasa; *gp60*: Glicoproteína de 60 kDa; ITS: Espaciador transcrito interno (*Internal Transcriber Spacer*); *ssu rRNA*: ARN de la subunidad pequeña del ribosoma; *tpi*: triosa fosfato isomerasa; VIC: 2'-Cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína.