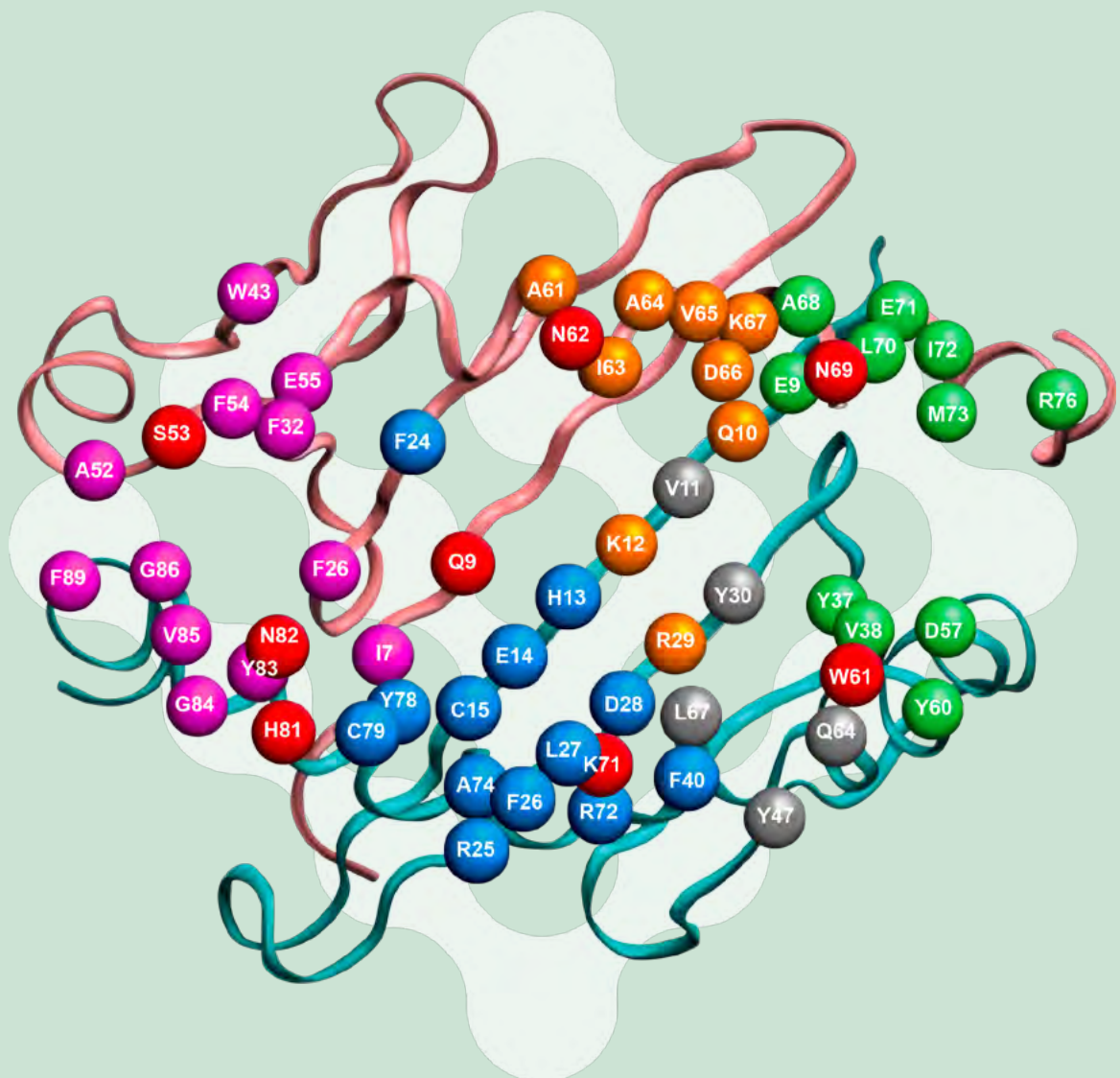


# ParaJournal

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PARASITOLOGÍA · SOCEPA

NUM.6 | ENE. 25



PARAJOURNAL

NUM.6 | ENE. 2025

# ParaJournal

# #6\_

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE PARASITOLOGÍA · **SOCEPA**

ENE. 2025

## EDITORIAL

Encargado del Comité Editorial:  
Carmen Cuéllar del Hoyo

## CONTACTO

Departamento de Parasitología  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid  
Plaza de Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria. 28040 Madrid  
[secretaria@socepa.org](mailto:secretaria@socepa.org)

## CRÉDITOS

Diseño: Antonio Diu  
Maquetación: Sergio Alba

Copyright 2025

© De los artículos: Sus autores.

ParaJournal no se hace responsable de las opiniones  
vertidas por los colaboradores en sus artículos e  
investigaciones reflejadas.

© ParaJournal Socepa ESP. 2025

Prohibida su reproducción, edición o transmisión total o  
parcial por cualquier medio y cualquier soporte sin la  
autorización escrita de ParaJournal Socepa España.

# ParaJournal

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE PARASITOLOGÍA · **SOCEPA**

ENE. 2025  
Num. 6



**socepa**

SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE PARASITOLOGÍA

## ParaHistoria

### Cajal y la Malaria

Antonio Muro Álvarez

Pág. 12-18

### Los parásitos en tiempos de Cajal

Juan González Fernández

Pág. 19-23

### Una relación para la Historia

José Antonio Garrido Cárdenas

Pág. 24-26

#### REVISIONES AMPLIAS

Pág. 27-336

### Carmen Martínez Fernández

Importancia clínico-epidemiológica de *Acanthamoeba* y *Legionella* en el ámbito hospitalario

Pág. 29-101

### Cynthia Machin Pérez

Lucha contra los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes: desafíos y métodos de control

Pág. 103-130

### Samantha Moratal Martínez

A review of emerging zoonotic parasites in marine fish

Pág. 131-168

### Belén González Bertolín

Revisión de helmintosis olvidadas y emergentes

Pág. 169-204

### Manuel Lacueva Arnedo

Historia y evolución del tratamiento frente a *Trichomonas vaginalis*

Pág. 205-268

### Blanca Tristán Escudero

Hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis* tras el uso de inmunosupresores en la terapia frente al SARS-CoV-2

Pág. 269-299

### Cecilia Vallejo León

BLASTOCYSTIS SPP.

Pág. 300-318

### Juan Carlos Manzano Ayuso

Meningoencefalitis amebiana primaria causada por la ameba "come-cerebros" *Naegleria fowleri*

Pág. 319-336



## Ángela Valcárcel Olmeda

Alfa-Gal, epítipo responsable de la alergia a la carne roja, en la garrapata mediterránea *Hyalomma lusitanicum* ..... Pág. 339-341

## Javier Colmena Zaragoza

Anticuerpos anti-*Anisakis* en pacientes con cáncer de colon y su relación con los linfocitos T  $\gamma\delta$  ..... Pág. 342-345

## Juan González-Fernández

La IgA sérica contribuye a la comprensión de la urticaria crónica asociada a *Anisakis simplex* ..... Pág. 346-349

## María Piedad de la Hoz Martín

Prevalencia de la anisakiosis en Madrid (España) tras 20 años de legislación preventiva ..... Pág. 350-353

## Celia Bolumburu Cámara

*Trichomonas vaginalis*: epidemiología en un hospital terciario y caracterización biomolecular de aislados clínicos ..... Pág. 354-357

## Miscelánea

## Normas de Publicación ParaJournal #7





# EDITORIAL

## ParaJournal

**E**stamos a punto de comenzar el año 2025 que marca el inicio de un nuevo cuarto del actual siglo XXI en el que confiamos en que no vuelva a suceder ninguna de las situaciones catastróficas que han sobrevivido. Calor y sequía extremos, incendios devastadores, huracanes y ciclones en diferentes partes del mundo e inundaciones y lluvias torrenciales en España, además de todos los conflictos bélicos activos a nivel mundial.

El último número de la revista Parajournal publicó los resúmenes presentados en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), celebrado el pasado septiembre en Sevilla, pero en este sexto volumen volvemos a poner a disposición de los lectores las secciones clásicas de la publicación.

La primera sección, dedicada a la historia de la Parasitología, incluye en esta ocasión los trabajos premiados en el I Homenaje "Salamanca: por Cajal y la Ciencia", donde se convocó el I Premio de Divulgación Cajal y la Parasitología, en relación al estudio de D. Santiago Ramón y Cajal de los parásitos y las enfermedades que ocasionan. Los trabajos premiados "Una relación para la Historia" y "Los parásitos en tiempos de Cajal" están precedidos por un resumen realizado por el Prof. Antonio Muro, sobre la contribución de Ramón y Cajal en la erradicación de enfermedades como la malaria, en el que relata cómo fue denunciado por un comandante del campamento por pasar muchas horas, según sus palabras, "mirando por un tubo", situación en la que se pueden ver reflejados numerosos parasitólogos, incluso en la actualidad.

La segunda sección de Parajournal contiene revisiones de tesis doctorales y trabajos de fin de grado cuya difusión resulta muy útil para la actualización de nuestros materiales didácticos. Las introducciones de las cinco tesis recibidas para su publicación, incluyen la importancia de *Acanthamoeba* en el ámbito hospitalario, una revisión histórica del tratamiento frente a *Trichomonas vaginalis*, así como, dos revisiones sobre zoonosis emergentes y otra sobre métodos de control de nematodos gastrointestinales. También se incluye un interesante TFM que revisa la reaparición de la infección latente de *Strongyloides stercoralis* en pacientes que reciben terapia inmunosupresora por COVID-19 además de otros dos trabajos sobre *Blastocystis* spp. y *Naegleria fowleri*.

“ en este sexto volumen  
volvemos a poner a  
disposición de los lectores  
las secciones clásicas  
de la publicación

”

La sección dedicada a Investigaciones breves, contiene una sinopsis de una tesis doctoral sobre la epidemiología de *Trichomonas vaginalis* en Madrid y cuatro resúmenes de artículos previamente publicados, uno de ellos sobre la prevalencia de la anisakiosis en Madrid tras 20 años de Legislación preventiva.

La sección de Miscelánea publica artículos en formato libre sobre cualquier campo de interés en Parasitología. En esta ocasión ofrece, entre otras cosas, los resultados de un proyecto de innovación educativa sobre la implementación de un sitio web de e-Parasitología en una universidad. También se incluyen las dos imágenes premiadas en el concurso de fotografía convocado en el pasado XXIII Congreso de la SOCEPA tituladas “Imagen pseudocoloreada de microscopía electrónica de barrido de biofilms *in vitro* de *Lotmaria passim*” y “Miradas mirantes”.

La publicación de este número coincide con el final de año y la Navidad, momento muy esperado por diferentes motivos por muchos de nosotros. Puede que algunos estén esperando los regalos de los Reyes Magos y si contemplamos este hecho desde el punto de vista parasitológico, la mirra despierta nuestra curiosidad, a pesar de que para algunos simbolizaba la brevedad de la vida, por su uso en el arte de embalsamar a los muertos.

La mirra es el aceite esencial obtenido de un arbusto leñoso de la especie *Commiphora myrrha*, producida principalmente en Somalia, Etiopía y el sur de la Península Arábiga y ha sido utilizada desde tiempos remotos, tal y como aparece en los escritos de Heródoto o en el Papiro Ebers. Sus usos principales estaban encaminados a momificar y embalsamar, como vulnerario y para frenar hemorragias, aunque, ya en escritos sumerios, se detalla su uso para el tratamiento de gusanos intestinales y fue usada por médicos medievales por sus propiedades antidiarreicas.

“ la mirra despierta nuestra curiosidad, a pesar de que para algunos simbolizaba la brevedad de la vida, por su uso en el arte de embalsamar a los muertos.

”

De la misma manera que en el antiguo Egipto ya era recolectada la resina de mirra y se preparaban recetas para su uso, los parasitólogos egipcios modernos han estudiado su eficacia en el tratamiento de *Fasciola hepatica*, *Schistosoma haematobium* y *Schistosoma mansoni*, así como, su actividad molusquicida sobre hospedadores intermediarios de *S. mansoni*.

Algunos científicos buscan su eficacia contra *Plasmodium* spp. basándose en el enorme potencial de los productos naturales contra la malaria (quinina de especies de *Cinchona* y artemisinina de *Artemisia annua*). Otros han demostrado su eficacia en mujeres infectadas con *Trichomonas vaginalis* resistente al metronidazol y al tinidazol.

De igual modo se ha probado, ocasionalmente con éxito, en artrópodos, como garrapatas de aves de corral (*Argas persicus*), garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) o larvas de *Aedes aegypti*, contribuyendo a la búsqueda de métodos de control de plagas novedosos y ecológicos. En este sentido, hay que resaltar que la revista *Science* acaba de presentar los diez avances científicos más destacados de 2024, entre los que incluye un innovador pesticida a base de ARN que ataca plagas, aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, diseñado contra el escarabajo de la patata, pero que esperan adaptar para intentar controlar otros artrópodos. Es digno de mención que la empresa inventora está desarrollando otro pesticida para matar al ácaro *Varroa* parásito de abejas.

En nombre de la Junta Directiva de la SOCEPA deseamos, a todos los miembros de la misma, un año 2025 lleno de salud, alegría y éxitos profesionales y personales.

Muchísimas gracias,

**Carmen Cuéllar del Hoyo**

Presidenta Sociedad Española de Parasitología

## RECORDANDO AL DOCTOR MANUEL ELKIN PATARROYO

# Maestro Querido:

Nunca me gustó el mes de enero. De niño mi madre no me dejaba salir. Decía que hacía mucho frío y me resfriaría. Además, faltaba mucho tiempo para que regresaran los Reyes Magos cargados de sorpresas. Recuerdo a mi padre que comentaba la dificultad para superar la cuesta de enero. En definitiva, nunca me gustó el mes de enero.

Cuando ya tuve independencia y capacidad de decisión, me iba a un país cálido. Concretamente al laboratorio dirigido por el Profesor Hillyer en la preciosa isla de Puerto Rico, mi director en mi época postdoctoral. Allí aprendí a trabajar con los parásitos tropicales, a los que he dedicado toda mi vida. Siempre he pensado que allí se llevaba mejor este desapacible mes.

El 14 de enero de 2022, murió mi padre. Tres años después, acaba de fallecer el Dr. Manuel Elkin Patarroyo, también en el mes de enero, el 9 del 2025. Me lo acaba de comunicar su entrañable hijo Manuel Alfonso Patarroyo. Mi padre, Eugenio Muro, fue mi maestro en la infancia. Manuel Elkin también fue mi maestro. Lo conocí en el primer congreso científico al que asistí. Aún era estudiante del último curso de la Licenciatura de Medicina y me quedé estupefacto cuando escuché la conferencia de apertura. La impartía un científico colombiano de mediana edad con mirada inteligente, de nombre Manuel Elkin Patarroyo. Me parecía que estaba escuchando un relato como si lo contara García Márquez, pero de ciencia. Explicaba con gran claridad y extrema rotundidad sus

trabajos realizados para el desarrollo de una vacuna de síntesis química frente a la malaria.

Un avance sin parangón para detener esta maliciosa enfermedad. Me cautivaron sus primeras palabras, cargadas de sabiduría e ingenio, dejando “clarito” (como él decía) las complejas relaciones para poder entender a un parásito astuto que utiliza todos sus recursos para entrar en las células, recorriendo nuestro organismo y pudiendo llegar a causar daños cerebrales graves.

Establecimos una relación más allá de lo profesional, más bien familiar. Cada vez que iba a Bogotá, me alojaba en su casa y entre sus admirables cuadros charlábamos de ciencia, arte, música, literatura, de los devaneos políticos y de la vida en todos sus aspectos. Me llamaba “Toñete” y con ese gracejo inteligente describía magistralmente cómo había llegado a diseñar una metodología lógica y racional para el desarrollo de vacunas. Era el mayor de los hermanos. Uno de ellos me contaba que de niño le hicieron unas pruebas en el colegio cuyos resultados revelaron un elevado índice intelectual. De las muchas anécdotas de Manuel Elkin, me llamo la atención cuando me decía que leyendo

de pequeño los experimentos realizados por Pasteur o Kock, supo con claridad a lo que iba a dedicar su vida. Recuerdo que la primera noche, durmiendo en su casa, me desperté muy temprano como consecuencia del jet lag. Serían las tres de la madrugada. Vi una luz en el salón y allí estaba Manuel Elkin rodeado de artículos científicos, leyéndolos en profundidad. Me dijo: "Toñete, tengo la suerte de ser insomne, solamente necesito dormir tres horas y así tengo más tiempo para estudiar".

Si tuviera que elegir la cualidad que más me ha llamado la atención de Manuel Elkin, es sin duda su profunda humanidad. Era un humanista convencido ya que defendía la dignidad humana, el carácter racional de las personas, su autonomía, libertad y la capacidad de transformación de la historia y la sociedad. Además lo trasladaba a todas las facetas de su vida. Siempre me impresionó cuando llegaba a un hotel. A todo el mundo le llamaba por su nombre, como si lo conociera de toda la vida. Los trataba con una educación exquisita: recepcionistas, camareros, el gerente del hotel. Todos se desvivían por atenderlo. Sin embargo, a veces, su excesivo humanismo le supuso algún que otro disgusto.

En estos momentos de tristeza afloran muchos recuerdos. Ahora son duros, luego el tiempo se encargará de suavizarlos y sonreiremos cuando nos acordemos de ti. Tu pérdida será insustituible, pero tu legado científico siempre nos quedará. Podemos leer los 388 artículos que refiere a día de hoy PubMed. Me viene a la mente un recuerdo que me llamaba mucho la atención; cuando venías a España siempre traías las publicaciones del último año, en algunos casos eran más de treinta y no solo en uno, sino en varios paquetes. Yo pensaba en lo convencido que estabas en demostrar al mundo el trabajo realizado por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Como decía Ramón y Cajal "con perseverancia y dedicación conseguiremos todo lo que nos propongamos".



“

*Si tuviera que elegir la cualidad que más me ha llamado la atención de Manuel Elkin, es sin duda su profunda humanidad.*

”

Mi querido maestro, mi adorable Manuel Elkin: descansa en paz, ya que tienes la gran suerte de tener a una persona que continuará con este gran proyecto. Igual que quisiste ser como Kock o Pasteur, tu hijo Manuel Alfonso Patarroyo seguirá con tu legado y algún día podrás alegrarte por los resultados de las semillas que sembraste.

Hasta siempre.

**Antonio Muro**

Catedrático de Parasitología de la Universidad de Salamanca.  
Expresidente de la Sociedad Española de Medicina Tropical (SEMTSI)  
Expresidente de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)

HOMENAJE

25 MARZO

2025



SANTIAGO  
RAMÓN  
Y CAJAL

SALAMANCA POR CAJAL Y LA CIENCIA

[santiagoramonycajal.org](http://santiagoramonycajal.org)

## 1 INTRODUCCIÓN

En el marco del **I Homenaje SALAMANCA: POR CAJAL Y LA CIENCIA**, que se celebró el miércoles 10 de abril de 2024 en el Teatro Liceo de Salamanca, fueron entregados los galardones correspondientes a la primera edición de los Premios Ramón y Cajal. Con motivo de la celebración, la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) convocó el **I Premio de Divulgación Cajal y la Parasitología** con el objeto de promocionar y ampliar el conocimiento científico específicamente en la relación que tuvo D. Santiago en el estudio de los parásitos y las enfermedades que ocasionan.

**Antonio Muro Álvarez**, Catedrático de Parasitología de la Universidad de Salamanca y entonces presidente de la Sociedad Española de Parasitología, participó en la entrega de premios realizando un resumen sobre la contribución de Santiago Ramón y Cajal en la erradicación de enfermedades como la malaria.

El **I Premio Cajal y la Parasitología** fue para los investigadores **José Antonio Garrido Cárdenas**, de la Universidad de Almería, por '**Una relación para la Historia**' y **Juan González Fernández**, de la Universidad Complutense de Madrid, por '**Los parásitos en tiempos de Cajal**'. Ambos trabajos abordan el tópico de la Parasitología desde la perspectiva cronológica de Santiago Ramón y Cajal.

“

*Con motivo de la celebración, la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) convocó el I Premio de Divulgación Cajal y la Parasitología con el objeto de promocionar y ampliar el conocimiento científico específicamente en la relación que tuvo D. Santiago en el estudio de los parásitos y las enfermedades que ocasionan.*

”



Entrega de premios del I Premio de Divulgación Cajal y la Parasitología a José Antonio Garrido Cárdenas, de la Universidad de Almería, por 'Una relación para la Historia' y Juan González Fernández, de la Universidad Complutense de Madrid, por 'Los parásitos en tiempos de Cajal'. En el teatro Liceo de Salamanca.

## CAJAL Y LA MALARIA

Cajal confesaba a un compañero de estudios: *“Me devora la sed insaciable de libertad y de emociones novísimas. Mi ideal es América, singularmente la América tropical”*. Con estas ideas, ingresó en el cuerpo de Sanidad Militar en 1873, ascendió a capitán médico y fue destinado a Cuba en plena guerra de la independencia, conocida como *“Guerra de los diez años”*, entre 1868 y 1878.

Partió de la ciudad de Cádiz a bordo del Vapor *“Correo Guipúzcoa”*, desembarcando en La Habana en la primavera de 1874. Al llegar a la isla, se encontró con un diseño estratégico para la defensa, basado en caminos con altas vallas que atravesaban el territorio de lado a lado, diseccionándolo con precisión quirúrgica. Este sistema se denominaba: *“trochas”*. En ellas se distinguían torres de vigilancia, pequeños fuertes y espacios destinados al almacenamiento de alimentos, enseres y a la atención de los enfermos en forma de pequeños hospitales y enfermerías.

Santiago Ramón y Cajal prestó servicios médicos en los campamentos de *Vista Hermosa* y de *San Isidro*, ambas áreas de difícil acceso con abundante vegetación y zonas pantanosas potencialmente peligrosas para la salud. El hospital de *Vista Hermosa* disponía de 200 camas instaladas en un barracón techado con hojas de palma donde Cajal instaló un improvisado laboratorio contiguo a la sala de atención a los enfermos. Estos, en su mayoría, padecían paludismo, disentería o tuberculosis. Fruto de su afición por la fotografía y la observación, y siempre acompañado de un microscopio, buscaba algún signo que explicara las dolencias en muestras de aguas estancadas. Fue denunciado por un comandante del campamento por pasar muchas horas, según sus palabras: *“mirando por un tubo”*, y pidió su sustitución inmediata. Pero ésta no se llevó a cabo, ya que poco tiempo después ocurrió lo evidente, Cajal enfermó de malaria y su salud se debilitó paulatinamente con episodios frecuentes de fiebres periódicas y anemia que le producía un acusado cansancio, lo cual le imposibilitaba atender adecuadamente a sus pacientes. Sin embargo, postrado en la cama, usaba sus mermadas fuerzas para estudiar inglés y así estar al día sobre los avances científicos procedentes del mundo anglosajón.

A pesar de las denuncias que realizó sobre el sistema de trochas como fuente insalubre y causa de muchas de las enfermedades que padecían los soldados, sus demandas no fueron atendidas y poco tiempo después fue trasladado al campamento de *San Isidro*, donde la situación sanitaria era peor que en *Vista Hermosa*. Su salud fue empeorando y tras ser diagnosticado de paludismo con graves secuelas, fue declarado inútil para la guerra. De esta manera y tras muchos sin sabores pudo regresar a la península a bordo del Vapor *España*, que atracó en Santander el 16 de junio de 1875.

Con el dinero que le debían de sus servicios prestados, adquirió a su regreso un microscopio, un micrótopo y diversos reactivos que le permitieron montar su primer laboratorio en Zaragoza. Su aspecto físico en nada se parecía al del joven que había partido a Cuba un año antes, pero tras pasar un tiempo en la casa familiar comenzó a mejorar su salud: *"Aunque no recobré la antigua pujanza ni logré sacudir enteramente la anemia palúdica, repusiéronme mucho el aire de la tierra, alimentación succulenta y los irremplazables cuidados maternos. De tarde en tarde, recidivaba la fiebre; pero ahora la quinina mostrábase más eficaz"*. Su amigo Federico Olóriz, catedrático de Anatomía, decía que en Cuba se había curado de su vocación militar, adquiriendo valores éticos y científicos que le acompañarían durante toda su vida. Tras su experiencia en la guerra de Cuba, Cajal concluyó: *"El investigador defiende a su patria con el microscopio, la balanza, la retorta o el telescopio"*.

Conoció íntimamente la malaria no solo por padecerla, sino por investigar los secretos de la enfermedad para poder combatirla con armas eficaces. En aquellos años aún se desconocía el mecanismo de transmisión de las fiebres palúdicas o malaria (nombre de procedencia italiana mal-aria: malos olores de los pantanos como medio de transmisión). El Dr. Laveran en 1880 observó por primera vez el parásito causante de esta afección y posteriormente Ronald Ross, estudiante de Medicina en Londres y médico militar en India, aisló las formas del parásito en el intestino de los mosquitos del género *Anopheles*. Le costó tiempo, esfuerzo y algún disgusto, hasta que demostró que los mosquitos se infectaban al picar a una persona ya enferma previamente de malaria. Estos estudios le sirvieron para obtener el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1902. Qué razón tenía Don Santiago cuando decía *"¡Cuán terrible es la ignorancia! Si por aquella época hubiéramos sabido que el vehículo exclusivo de la malaria era el mosquito, España habría salvado miles de infelices soldados, arrebatados por la caquexia palúdica en Cuba o en la península"*.

Su afición al dibujo le llevó a esquematizar en papel las fases sanguíneas de *Plasmodium malariae* en la "figura 91" del Manual de Anatomía Patológica General y Fundamentos de Bacteriología (Figura 1), cuya primera edición fue publicada en 1890 y que utilizaron sus alumnos como libro de texto.

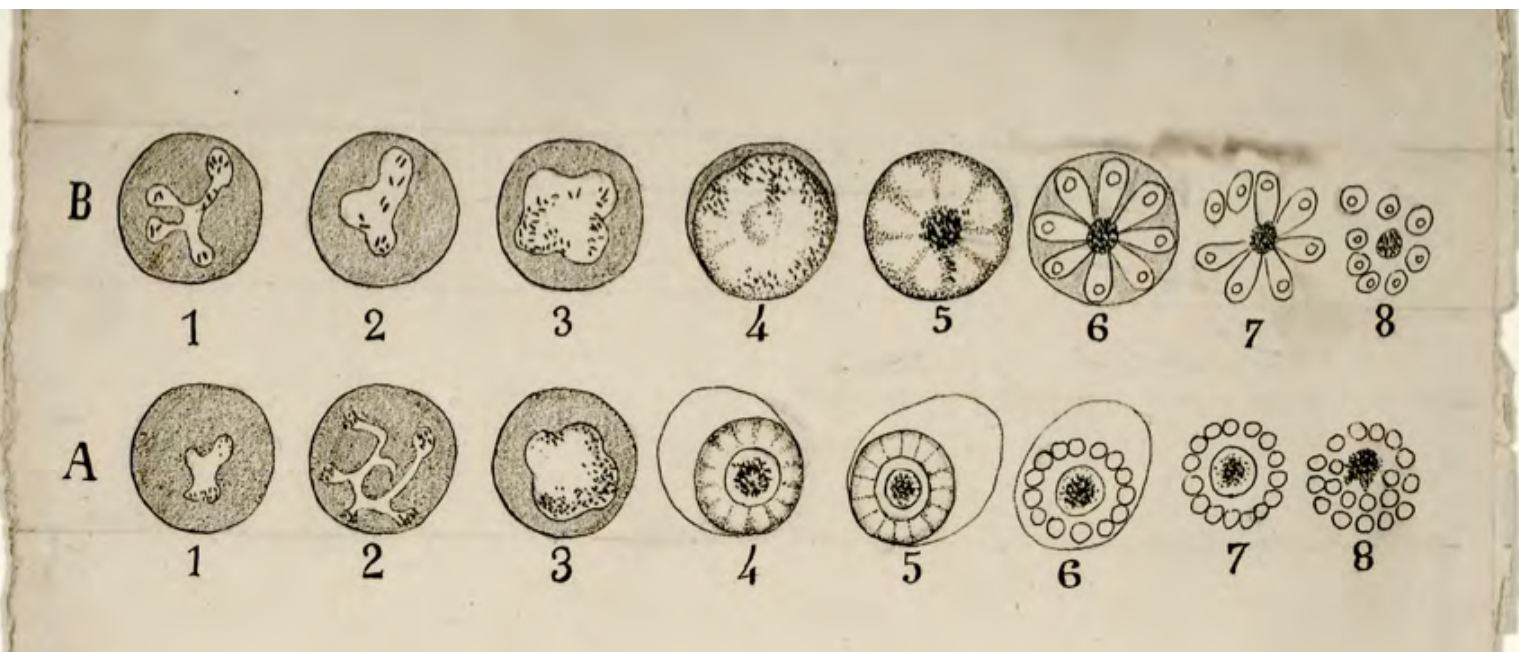


Figura 1. Cajal dibujando *Plasmodium* spp.

En palabras de Fernando Castro, Don Santiago siempre quiso que los estudiantes tuviesen buenos manuales para aprender, pensados y escritos por españoles, con dibujos y esquemas originales. Ya en la cuarta edición del Manual, publicado en 1905, aparece en la "figura 112" el ciclo completo de *Plasmodium vivax*, causante de las fiebres tercianas (lunes fiebre, martes sin fiebre, miércoles de nuevo fiebre), incluso ya aparecen ilustraciones con el mosquito transmisor y las fases del parásito en el interior del vector (Figura 2).

— XVIII.—FLEGMASÍAS INFECCIOSAS.....		
1.	Leucemia.....	379
4.	Leucemia.....	379
5.	Parásitos de la sangre.— Parásitos vegetales.— Espirilo de Obermier.— Bacterias de la septicemia.....	380
6.	Parásitos animales.— <i>Plasmodium malarie</i> .....	382
7.	<i>Tripanosomas</i> .....	388

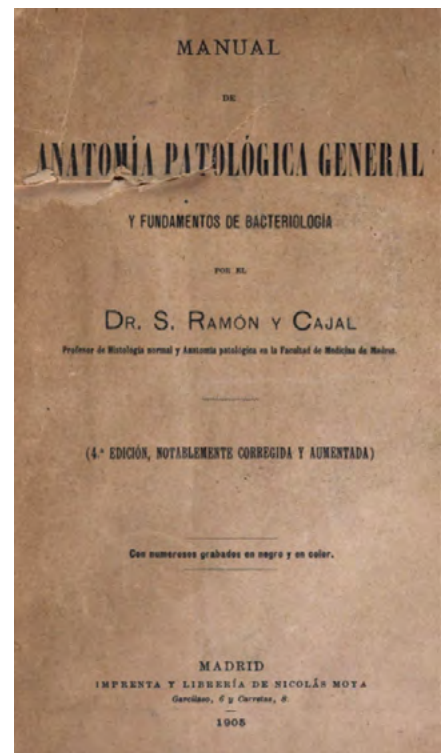


Figura 2. Cajal y sus libros

También dibuja con maestría en la "figura 114" la posición que adopta *Anopheles pseudo-pictus* al pararse verticalmente en la pared (Figura 3).

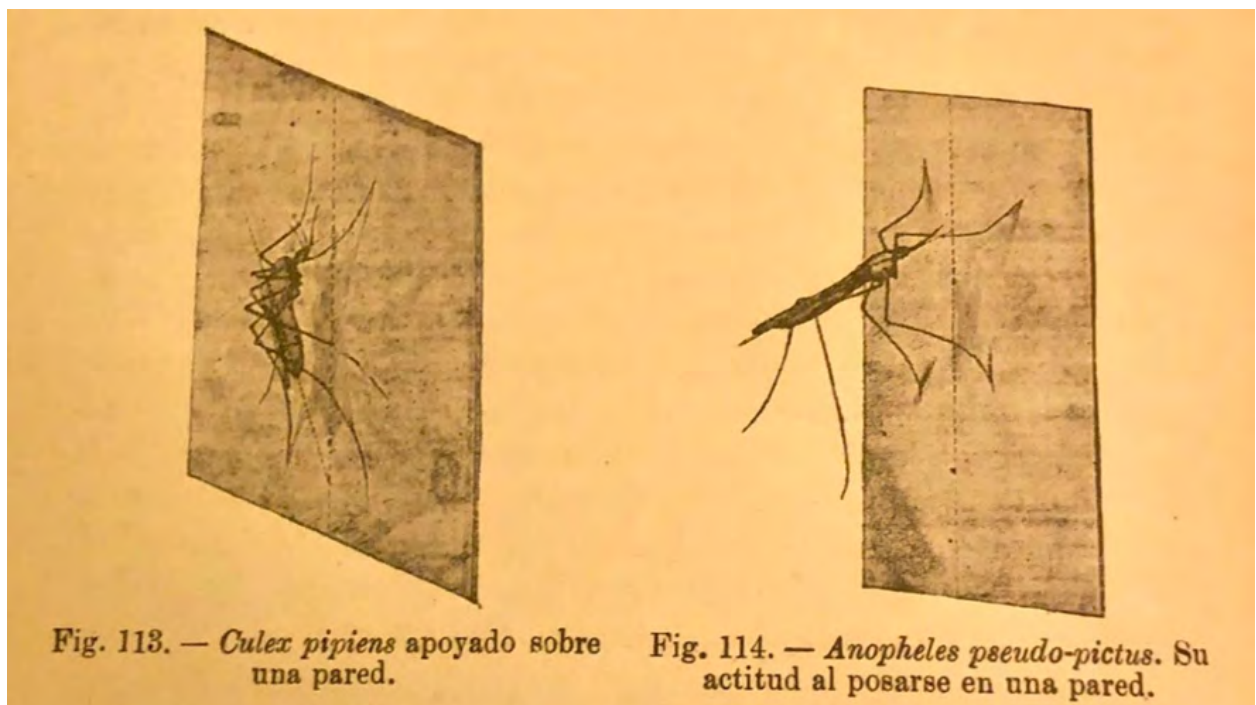


Fig. 113. — *Culex pipiens* apoyado sobre una pared.

Fig. 114. — *Anopheles pseudo-pictus*. Su actitud al posarse en una pared.

Figura 3. Cajal y sus ilustraciones

**E**n 1899 se creó el Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII, cuyo primer director fue Santiago Ramón y Cajal (Figura 4). Se incorporaron al Consejo de Administración del Instituto no solo médicos, sino también farmacéuticos y veterinarios, lo que supuso en aquella época una gran novedad por el carácter multidisciplinar de los investigadores. Otro avance fue la incorporación de secciones relacionadas con la microbiología (especialmente la bacteriología), la inmunología con la fabricación de suero antidiftérico para tratar los niños asfixiados con difteria o la preparación de vacunas antivariolicas o antirrábicas.



## Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII

El Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII fue creado en 1899 por el doctor don Carlos. Dissueltas por ley de 25 de octubre las Secciones de Bacteriología e Higiene y Vacunación, el mismo día se fundó el Instituto de Higiene y Vacunación y Bacteriología. Constituyen las secciones de Higiene y Vacunación y Bacteriología y Química. Pa- ra 200 pesetas de matrícula, pero el material que consumen cuesta mucho más. Ahora que vamos viendo sin grandes aprietos, porque nos administramos lo mejor que podemos.

El doctor Tello habla del Instituto con orgullo. «Como no, si es la obra del insigne Ramón y Cajal y él, discípulo predilecto del maestro, es su continuador? Na protesta de no poder realizar su misión libre por completo de preocupaciones económicas. Tan sólo, en su deseo de que el Instituto pudiera hacer más todavía de lo que hace, tiene unas palabras de lamentación.

«Es una verdadera lástima que no podamos ahora contar con el trabajo de la fabricación y venta de productos bacteriológicos y de la com- paración de sueros y vacunas. Con-

cesarias? ... Estado nos subvenciona con ochenta mil pesetas y paga el personal; pero ha habido años que las ochenta mil pesetas se han gastado casi enteras en gas, carbón, electricidad y agua.

«¿Tienen ustedes otros ingresos? ... Únicamente el que nos proporcionan los alumnos de nuestros cursos de Bacteriología y Química. Pa- ra 200 pesetas de matrícula, pero el material que consumen cuesta mucho más. Ahora que vamos viendo sin grandes aprietos, porque nos administramos lo mejor que podemos.

«¿Qué pocos españoles habrá que conozcan el nombre de este mártir de la ciencia, de este hombre que perdió la vida hace trece años por hacer bien a sus semejantes? Se ha hecho algo por glorificar su memoria? ¿Triste sino el de estos hom- bres que exponen su vida sin otra compensación que la satisfacción íntima del deber cumplido? ... En la Sección de Química nos recibe el jefe interino D. Tomás Gar- mendía. Se hallan vacantes la je-

ter en Navalmaral de la Mata, y he- mos logrado reducir los casos de una manera considerable. Para ello tuvimos que vencer al principio la resistencia de los mismos atacados; pero en los últimos años la cifra de mortalidad ha bajado de 634 por 10.000 habitantes en Cáceres, y así en las demás regiones afectadas por el paludismo.

«¿Cuáles son las provincias don- de hay más paludismo? ... Cáceres, Badajoz, Huelva, Al- cantar, Salamanca, Cádiz, Ciudad Real, Murcia, Córdoba y Sevilla, en las que la mortalidad por paludis- mo varía entre el máximo de 4,13 por 10.000 habitantes en Cáceres, y el mínimo de 1,20 en Sevilla. Pero hemos de seguir luchando, y acar- ramos por destruir de España esa vergonzosa endemia.

Nos despedimos del doctor Sadi de Buen ofreciendo aceptar la in- vitación que nos hace de que visi- temos el Instituto Antipalúdico de Navalmaral de la Mata para ha- cer una buena información de la lucha contra el paludismo, y nos dirigimos a la Sección de Vacuna- ción.

El jefe, doctor Luis Rodríguez Mera, nos dice que la cifra prome- dia de personas que acuden al Ins- tituto a vacunarse contra la virue- la es de un millón.

«Ha habido algún año en que, por haberse producido entre el pú- blico una alarma o por haber dictado las autoridades disposiciones sanitarias, los vacunados aquí han pasado del millón y medio a más.

«¿Es gratuita la vacuna? ... Completamente gratuita. Los sueros se preparan en la Sección de Bacteriología, y no sólo se admi- nistran en vacunaciones, sino que se facilitan a las personas necesi- tadas.

Visitamos luego el Parque Sani- tario, cuya Jefatura está también vacante, y admiramos después las largas hileras bonas de conejos y de ratas que han de servir para los trabajos de experimentación; y al estubo donde están las leoneras proveedoras de suero antivarioloso.

tratamiento; pero un noventa y cinco por ciento de los tratados vienen con el certificado de pobreza exten- dido por sus respectivos Ayunta- mientos.

«¿Cuál es el animal que da ma- yor contingente de atacados? ... El perro. Según la última esta- dística que he hecho, de 1.377 casos tratados, 1.192 fueron causados por mordeduras de perro; 241, por mor- deduras de gato, y los demás, por ratas, vacas, mulas, cerdos, monos, cabras, zorras y burros. Sólo ha ha- bido seis casos de rabia humana, y uno por inoculación con material vi- rulento. Estoy terminando la esta- dística del año pasado, y las proporciones no difieren ostensiblemente de los datos anteriores.

El doctor Ramón y F. fanás nos explica luego cómo se verifican los análisis de los animales causantes de las mordeduras para comprobar si están o no rabiosos, extrañando- les de la cabeza los orificios con-



Mientras el doctor Ramón y Fañás explica a nuestro compañero Barangé-Solt en qué consiste el tratamiento antirrábico, un paciente se prepara a sufrir el pinchazo vacunal.

**CASI EN BROMA**  
**La selección profesional**

Investigar la vocación y las aptitudes de los hijos es el más difícil y grave de los estudios que al padre incumben. Ayúdale el maestro, y colabore el niño en la obra, conciente o inconscientemente.

Los seleccionadores quieren siempre acertar.

Son, sin embargo, arduas las complejidades del asunto, abrumadoras las seducciones del desgozadero y múltiples las causas torcedoras del acierto.

El nuevo plan de Segunda ensu- mación exige advertir vocaciones y aptitudes cuando las puererías terminan el bachillerato elemental, y se ha de salvar sendero de Ciencias o de Letras.

Figura 4. Cajal director del Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII

En 1905, promovido por Cajal, se inicia una intensa labor docente, ya que aún no existía la Microbiología Médica como asignatura independiente en la licenciatura de Medicina. En 1907 se crea en el Instituto la Sección de Parasitología y en 1911 la primera cátedra de Parasitología y Patología Tropical en la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Madrid. Mientras tanto, los casos de malaria se estaban incrementando en España, principalmente en las regiones del suroeste de la península. El Dr. Sadí de Buen dirigía la sección de Parasitología del Instituto y estaba implicado en las campañas para combatir la malaria, junto con el Dr. Gustavo Pittaluga que posteriormente dirigió el Instituto en 1934 que pasó a denominarse: Instituto Nacional de Sanidad.

Las cifras de mortalidad de paludismo en aquella época llegaron a alcanzar 60 defunciones por cada 100.000 habitantes, siendo la provincia de Cáceres la más afectada. Los datos de mortalidad por regiones y meses del año se recogen en el libro publicado en 1923 por el Dr. Pittaluga bajo el título "Enfermedades de los Países Cálidos y Parasitología General" (Figura 5).

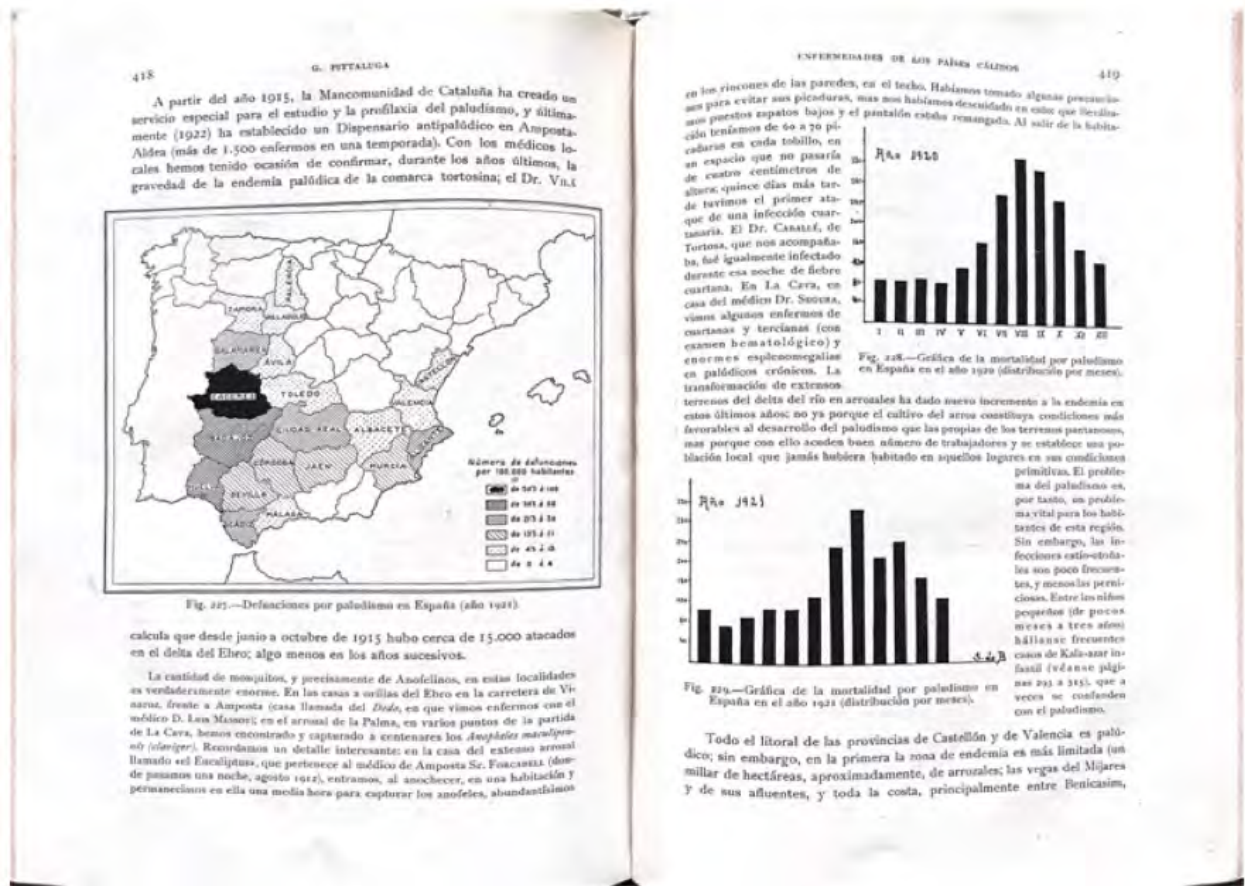
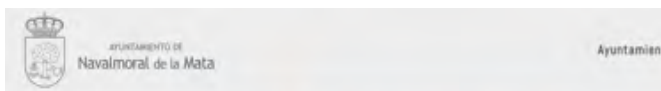


Figura 5. Datos de malaria en España en 1920

Dada la situación epidemiológica del paludismo en nuestro país, en 1924 se creó el Instituto Antipalúdico de Naval Moral de la Mata, fundado por el Dr. Sadí de Buen en una zona endémica de la enfermedad (Figura 6).



### INSTITUTO NACIONAL ANTIPALÚDICO





Figura 6. La lucha antipalúdica en España

Además, se nombró una comisión de expertos internacionales para la lucha antimalárica en España (Figura 7).

Diez años después de haber sido fundado el Instituto Antipalúdico de Navalmoral de la Mata, falleció Don Santiago Ramón y Cajal. Tuvo la suerte de no vivir la Guerra Civil Española y sufrir la muerte, el 3 de septiembre de 1936, de su discípulo Sadí de Buen, un eminente científico que batalló para erradicar el paludismo.

“ Diez años después de haber sido fundado el Instituto Antipalúdico de Navalmoral de la Mata, falleció Don Santiago Ramón y Cajal. ”

Después de todo, su lucha no fue en vano, ya que, en el trigésimo aniversario de su muerte, la malaria fue por fin erradicada en España.

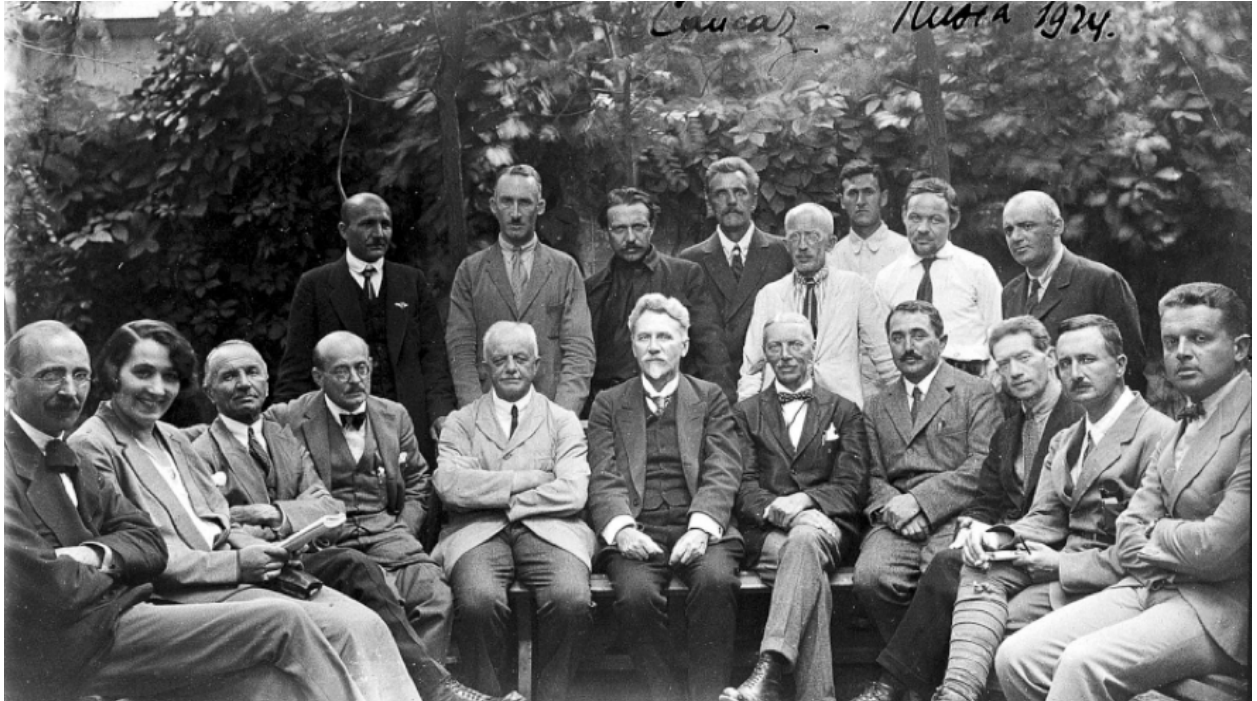


Figura 7. Comité de expertos internacionales en la lucha antipalúdica

# LOS PARÁSITOS EN TIEMPOS DE CAJAL

**D**. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) fue médico, histólogo, neurocientífico, pintor, fotógrafo, escritor, gimnasta y premio Nobel de Fisiología y Medicina por su teoría neuronal. Además, fue un gran impulsor de la parasitología en España (Callabed, 2019).

Justo al terminar la carrera de Medicina en Zaragoza, el 31 de agosto de 1873 y, a pesar de la oposición su padre, ingresó en el Cuerpo de Sanidad Militar (Martínez, 2023). Fue llamado a filas para atender a los heridos en la Guerra de Cuba y allí padeció paludismo en el año 1874 (Figura 1) (Gómez-Lus y Ramos, 2006).

“*Al fin flaqueó mi resistencia y enfermé del paludismo. Nubes de mosquitos nos rodeaban: además del *Anopheles claviger*, ordinario portador del protozoario de la malaria, nos mortificaba el casi invisible gégén, amén de ejército innumerable de pulgas, cucarachas y hormigas*” [...].  
“*Sentí el cerco de la fiebre sobre mi piel. Busqué el sulfato de quinina* [...]. *Afloraba el color amarillo, mi corazón latía enloquecido.*”

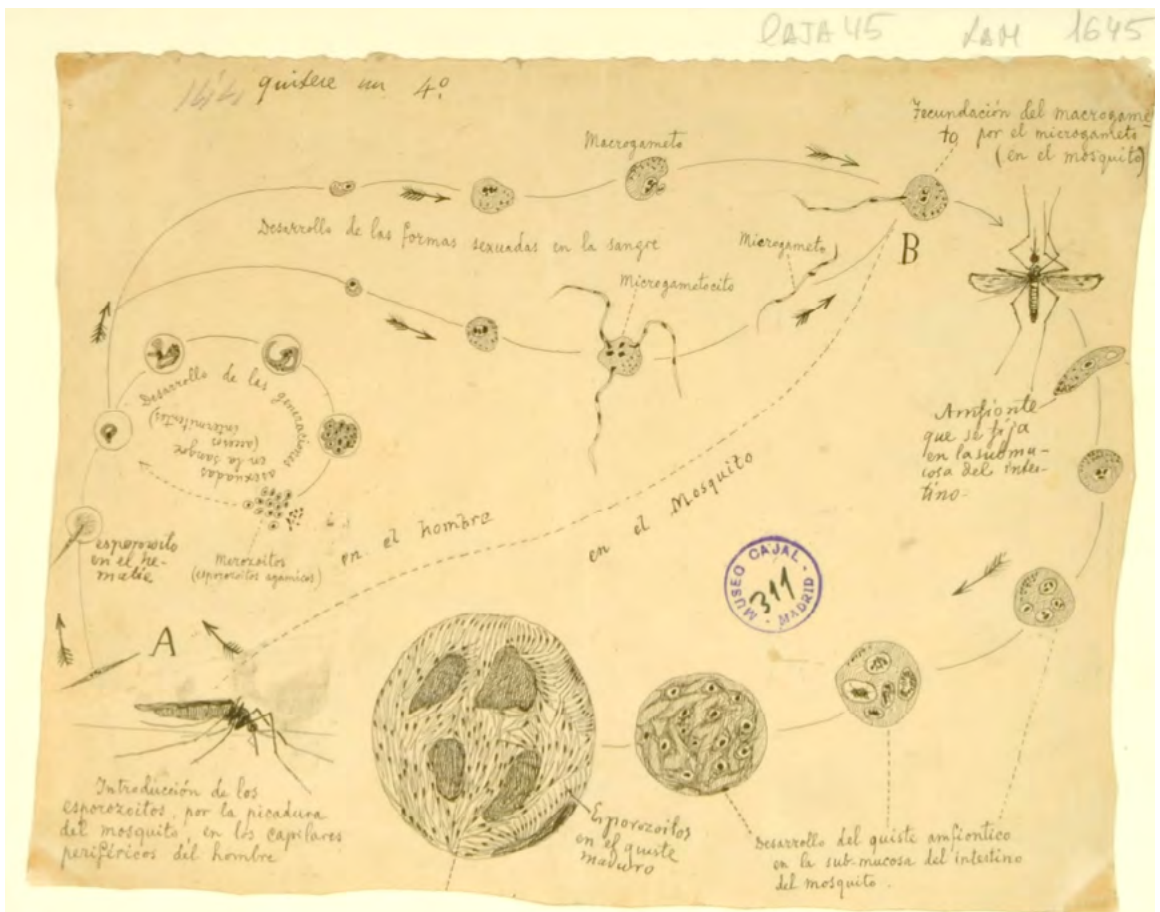


Figura 1. Ciclo completo de *Plasmodium vivax* por Santiago Ramón y Cajal.

Tras su vuelta, en 1877 se doctoró en la Universidad Central de Madrid con 25 años y se casó con Silveria Fañanás García, ocupando en ese momento el puesto de Director de los Museos de Anatomía en Zaragoza. Tras obtener la cátedra en Valencia (1883) y más tarde en Barcelona (1887), se trasladó a Madrid obteniendo la Cátedra de Histología e Histoquímica Normales y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Madrid (1892).

En 1896 publicó la segunda edición del Manual de Anatomía Patológica General y de Bacteriología Patológica; que sirvió de libro de texto a sus alumnos y en el que incluyó 320 grabados en color y en blanco y negro; entre ellos destaca uno sobre las fases del ciclo de *Plasmodium* (Figura 2).



Figura 2. Grabado en blanco y negro de Cajal sobre las fases de *Plasmodium* (Ramón y Cajal, 1896).

**E**l capítulo VIII (lesiones de las mucosas) del anteriormente citado manual, en concreto el punto 4, está dedicado a los parásitos intestinales (Ramón y Cajal, 1896). Cajal describió, en primer lugar, los nematodos. Afirmaba que tenían ciclos directos y que afectaban al intestino humano tras la ingesta de sus huevos. Como principales especies destacó "*Ascarides lumbricoides*" (*Ascaris lumbricoides*) como una lombriz gruesa de huevos de 50 a 60 micras de diámetro con una cáscara granulosa y afirmó que "se ignora cómo evolucionan". "*Oxiures vermicularis*" (*Enterobius vermicularis*) filiforme, de 4 y 10 milímetros de longitud para machos y hembras respectivamente, y "habita por millares en el recto de los niños". Describió sus huevos y su morfología. "*Tricocefalo dispar*" (*Trichuris trichiura*) cuya hembra presenta "la región de la cabeza delgada como un cabello, mientras que la porción posterior del cuerpo es gruesa y enrollada en espiral". Los huevos estaban descritos a la perfección, "alargados y con un nódulo en cada extremo". "*Strongylus duodenalis*" (*Ancylostoma duodenale*) con su cabeza de "cuatro ganchos". Describe la bolsa copulatriz en el extremo posterior y afirma que es tropical afectando al duodeno, chupando la sangre y produciendo anemia. "*Anguilula stercoralis*" (*Strongyloides stercoralis*) y "*Trichina espiralis*" (*Trichinella spiralis*) de la que describe a la perfección su ciclo y epidemiología.

En segundo lugar, los cestodos "Cestoides". Cajal describió los ciclos y la morfología de: "*Tenia solium*" (del cerdo), "*Tenia medio-canellata*" (saginata o de la vaca), "*Botriocephalus latus*" (*Dibothriocephalus latus*) como la tenia del pescado, "*Tenia equinococcus hidatidosus/multilocularis*" (*Echinococcus granulosus/multilocularis*) como la "tenia pequeña; del perro" y cuya presencia de quistes "ocasiona graves presiones y atrofas".

“ Describe la bolsa copulatriz en el extremo posterior y afirma que es tropical afectando al duodeno, chupando la sangre y produciendo anemia. ”

En tercer lugar, describió a los protozoos parásitos. Estos organismos eran todavía grandes desconocidos tanto en su morfología detallada como en su patogénesis. "*Cercomonas intestinalis*", (*Giardia intestinalis*) lo describe como un "infusorio flagelado, piriforme, con larga cola movable" que en realidad hoy conocemos que son 8 flagelos. No menciona los dos núcleos. Las tricomonas son descritas en dos especies: vaginal e intestinal y con solo dos flagelos. Actualmente, sobre *Trichomonas vaginalis* conocemos que presenta 4 flagelos libres y uno recurrente que Cajal describió como "peine de pestañas en un lado". Además, cita equivocadamente que ninguna de las dos especies era patógena. "*Balantidium coli*", fue descrito perfectamente dentro de los ciliados y "*Amoeba coli*" (*Entamoeba histolytica*) como causante de disentería.

En el Capítulo IX (Alteraciones de las glándulas); en el punto 4 se explican las alteraciones del hígado dónde habla de parásitos animales y dice que "se hallan alguna vez los distomas" (con dos bocas): "*Distoma hepaticum*" y "*Distoma hematobium*". Principalmente trata "*Distoma hepaticum*" (*Fasciola hepatica*), aunque también menciona "*Distoma lanceolatum*" (*Dicrocoelium dendriticum*) "más lanceolado y pequeño que el anterior y no tan ofensivo" siendo raro en el aparato biliar del hombre y prefiriendo el de los bóvidos. También describió "*Coccidium oviforme*" (*Eimeria* spp.).

En el capítulo XI (Lesiones del sistema tegumentario; punto 4) describió "*Acarus scabiei*" (*Sarcoptes scabiei*) macho y hembra y el depósito de sus huevos en las galerías observadas en biopsias de piel. También describió "*Acarus folliculorum*" (*Demodex folliculorum*) parasitando las glándulas sebáceas de la mejilla, frente y nariz.

Además, en tiempos de Cajal, los parásitos estaban relacionados con el cáncer. Se creía que los tumores tenían dos posibles orígenes. Por un lado, algunos profesores de anatomía patológica defendían un origen histogénico en el que las células tumorales eran células normales del tejido correspondiente, pero fuera de control; mientras que otros defendían la teoría parasitaria. Ésta afirmaba que el cáncer se originaba por parásitos que colonizaban el organismo. El médico escocés William Russell (1852-1940), en 1890, encontró partículas que se teñían con fucsina en los cortes histológicos de los tumores. Él interpretó que eran parásitos y los llamó cuerpos de Russell. Más tarde, Cajal demostró que los cuerpos de Russell no eran más que gránulos hipertrofiados de los mastocitos (Martínez et al., 2005).

**E**n 1887 ya se había fundado el instituto Pasteur y empezaron a crearse escuelas o institutos de medicina tropical en Liverpool (1898), Londres (1899) y Hamburgo (1900) para el estudio de las enfermedades parasitarias. Gracias a la iniciativa y al impulso de Cajal, España comenzó a modernizarse científicamente mediante la creación de la Junta de Ampliación de Estudios, de la que fue presidente desde que se creó en 1907. Ese mismo año, Cajal, siendo director del Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII, propuso la creación de la Sección de Parasitología y en 1910 la Cátedra de Parasitología y Patología Tropical en la Universidad Central de Madrid.

En 1909 Cajal propuso al presidente Antonio Maura realizar una expedición científica para el estudio de la enfermedad del sueño en las colonias españolas del golfo de Guinea. Esta expedición tenía una finalidad económica, ya que las colonias sufrían el azote continuo de esta enfermedad parasitaria, así como de la malaria y la disentería amebiana. El jefe de la Comisión científica fue el florentino Gustavo Pittaluga (experto en malaria y codescubridor del mosquito *Anopheles* como vector de *Plasmodium*). Luis Rodríguez Illera y Jorge Ramón Fañanás (1885-1938), hijo de Cajal, fueron participantes de la expedición (Corral-Corral y Quereda, 2012).

En conclusión, Cajal recopiló en sus tratados importantísimos conocimientos sobre parasitología, creó una sección específica en el Instituto de Higiene y una cátedra universitaria en la materia, promoviendo así el conocimiento de las enfermedades parasitarias y sentando las bases de la parasitología como ciencia en España.

“

*Cajal recopiló en sus tratados importantísimos conocimientos sobre parasitología, creó una sección específica en el Instituto de Higiene y una cátedra universitaria en la materia, promoviendo así el conocimiento de las enfermedades parasitarias y sentando las bases de la parasitología como ciencia en España.*

”

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Callabed, J. (2019). *Una Mirada a Santiago Ramón y Cajal en su perfil humanista: discurso de ingreso en la Real Academia Europea de Doctores, como académico de número, en el acto de su recepción el 16 de enero de 2019*. Real Academia Europea de Doctores.
2. Corral-Corral, I., & Quereda Rodríguez-Navarro, C. (2012). Gustavo Pittaluga and the expedition to study sleeping sickness in the Spanish territories of the Gulf of Guinea (1909). *Revista de neurología*, 54(1), 49–58.
3. Dibujo científico de Santiago Ramón y Cajal, ciclo completo de las formas parasitarias de *Plasmodium vivax*, parásito de la terciana (153x197 mm; tinta china negra). Santiago Ramón y Cajal. Depósito Legado Instituto Cajal. H4-Caja 45-Lámina 1645. Depositado para su custodia en el Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC. <http://simurg.csic.es/view/9918477706904201>
4. Gómez-Lus Centelles, M. L., & Ramos Tejera, M. C. (2006). *Santiago Ramón y Cajal: bacteriólogo* (J. Á. García Rodríguez, J. González Núñez, & J. Prieto Prieto, Eds.). Editorial Ars Medica.
5. Martínez, A., Marín, V. G., Junquera, S. R. Y. C., Martínez-Murillo, R., & Freire, M. (2005). The contributions of Santiago Ramón y Cajal to cancer research — 100 years on. *Nature Reviews. Cancer*, 5(11), 904–909. <https://doi.org/10.1038/nrc1741>
6. Martínez, E. P. (2023). Ramón y Cajal, “Un sabio de armas tomar”. *Revista Española de Defensa*, Año 36; (411), 60-61.
7. Ramón y Cajal, S. (1896). *Manual de anatomía patológica general seguida de un resumen de microscopía aplicada á la histología y bacteriología patológicas*. Imprenta y Librería de Nicolás Moya.
8. *Santiago Ramón y Cajal: 150 años en la Universidad de Zaragoza*. (2019). Prensas de la Universidad de Zaragoza.

# UNA RELACIÓN PARA LA HISTORIA

Recordaba nítidamente los ojos cansados de aquella niña, treinta y cinco años después. Ya había terminado la estación seca, la más calurosa en la isla, pero los vientos terrales que venían del continente (*harmat*, para los nativos) hacían que el calor abrazara el terreno. Su madre la abanicaba con varias hojas de una planta de cacao, pero la niña, que presentaba desde hacía unos días somnolencia diurna excesiva, apenas reaccionaba, inmovilizada por la fiebre. Recordaba, además, cómo al mirar al médico del poblado, éste asentía en silencio y se lo confirmaba: *Tripanosoma* en sangre..

Gustavo Pittaluga lo recordaba, desde su exilio en La Habana. El sol del Caribe entraba cauteloso por la ventana de su apartamento y recorría las arrugas de toda una vida mientras él se asomaba al pasado. A lo lejos, el mar y el Malecón. Eternos. Idénticos a los que lo recibieron por primera vez a finales de 1937, cuando la Institución Hispano-Cubana de Cultura lo invitó, a través de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Habana y el Instituto Finlay, a dar un curso sobre Hematología. De aquello hacía ya más de un lustro.

Ahora, al echar la vista atrás, era imposible no tropezar de nuevo con la mirada de aquella niña. El análisis sanguíneo, la característica alteración del ciclo vigilia-sueño y el claro edema facial que presentaba no le dejaron lugar a dudas. La pequeña estaba afectada de tripanosomiasis africana, *la enfermedad del sueño*.

Los territorios del Golfo de Guinea, a pesar de pertenecer a España desde finales del Siglo XVIII—cuando Portugal se los cedió en el conocido como Tratado del Pardo—, representaban una región sobre la que existía un escaso control. Pero en 1907 sucedió algo que iba a cambiar esta situación. En ese año se creó la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (JAE), al amparo de la Institución Libre de Enseñanza, cuyo objetivo fundamental era la promoción de la investigación y la educación científica en España. Y a la cabeza del proyecto colocaron al que acababa de convertirse en el primer científico español en obtener el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, Santiago Ramón y Cajal. Una de sus obsesiones, desde que cogió el timón de la nueva institución, pasaba por la modernización de la estructura científica del país. Para ello, la expansión del conocimiento científico patrio más allá de nuestras fronteras era una de sus estrategias. Así, creó la sección de parasitología del Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII y diseñó una expedición de estudios científicos que habría de ponerse rumbo a los territorios españoles del golfo de Guinea para estudiar la enfermedad del sueño.

U nos años antes, en 1903, había llegado a España el joven médico italiano Gustavo Pittaluga. Por entonces, el florentino tenía veintisiete años, pero ya había dado muestras de su genialidad. Su agudeza intelectual no había pasado desapercibida para Cajal, y tal fue así, que cuando Pittaluga asistió al XIV Congreso Internacional de Medicina, en Madrid, en el caluroso verano de ese año de 1903, los caminos de ambos genios se cruzaron para siempre, esculpiendo una relación para la historia. Antes, el italiano había adquirido una amplia formación en el laboratorio del Catedrático en Anatomía Comparada Battista Grassi, conocido por su investigación en torno al papel del mosquito anófeles en la transmisión de la malaria. Pero los intereses del joven Gustavo Pittaluga en el ámbito de la parasitología se extendían mucho más allá de las fronteras de esta enfermedad.

Así que Cajal no lo dudó. En cuanto tuvo que elegir, lo señaló como la persona que dirigiría la expedición científica a las colonias españolas del golfo de Guinea, como jefe de la comisión. Por entonces, la parasitología médica y la biología experimental eran ciencias que apenas comenzaban a gatear, pero Pittaluga dio muestras de su buen hacer en el estudio de la enfermedad del sueño y las condiciones sanitarias en las que ésta tenía lugar en aquellos lugares del trópico africano. Cajal tenía como modelo las misiones científicas inglesas o alemanas, con delegaciones de bacteriólogos recorriendo la costa de África occidental, a pesar de sus deficiencias. Carecían de un método que las hiciera fiables e incluso de una mínima profilaxis que facilitara un diagnóstico racional, pero el científico español sabía que eran fundamentales para el progreso de la ciencia, cuya misión principal pasaba por hacer habitable todo el planeta.

“Cajal tenía como modelo las misiones científicas inglesas o alemanas, con delegaciones de bacteriólogos recorriendo la costa de África occidental, a pesar de sus deficiencias.”

La expedición partió de Cádiz el 30 de mayo de 1909 y, tras 45 días de navegación, llegaron a la isla de Fernando Poo (hoy, Bioko). Durante cuatro meses recorrieron numerosos territorios en los que analizaron y describieron el medio, pormenorizaron los detalles del clima, analizaron las regiones donde había agua, tanto estancada como en movimiento, y estudiaron las costumbres y modos de vida de la población. A partir de todos estos datos, indagaron la presencia en la región de la enfermedad del sueño y de otras parasitosis.

Hoy sabemos que la enfermedad del sueño, o tripanosomiasis africana, es producida por dos subespecies del parásito *Tripanosoma brucei*, conocidas como *T. b. gambiense*, localizada en África subsahariana central y occidental, y *T. b. rhodesiense*, en África oriental. Pero en el momento de la expedición española, no se había logrado diferenciar aún entre ambas, indistinguibles morfológicamente entre sí. Lo que sí se empezaba a saber era que las moscas del género *Glossina* —la mosca tse-tse— representaban los vectores responsables de transmitir la enfermedad con sus picaduras, y que cuando no era tratada y afectaba al tejido cerebral, podía incluso provocar un coma o la muerte. En éstas y en otras cuestiones incidió la expedición de la que el equipo de Pittaluga extrajo, como principal conclusión, que la tripanosomiasis había invadido numerosos puntos de la región. Por suerte, aunque la enfermedad se encontraba muy extendida entre las tribus que habitaban el territorio, la epidemia resultó ser mucho menor que la de otras colonias africanas.

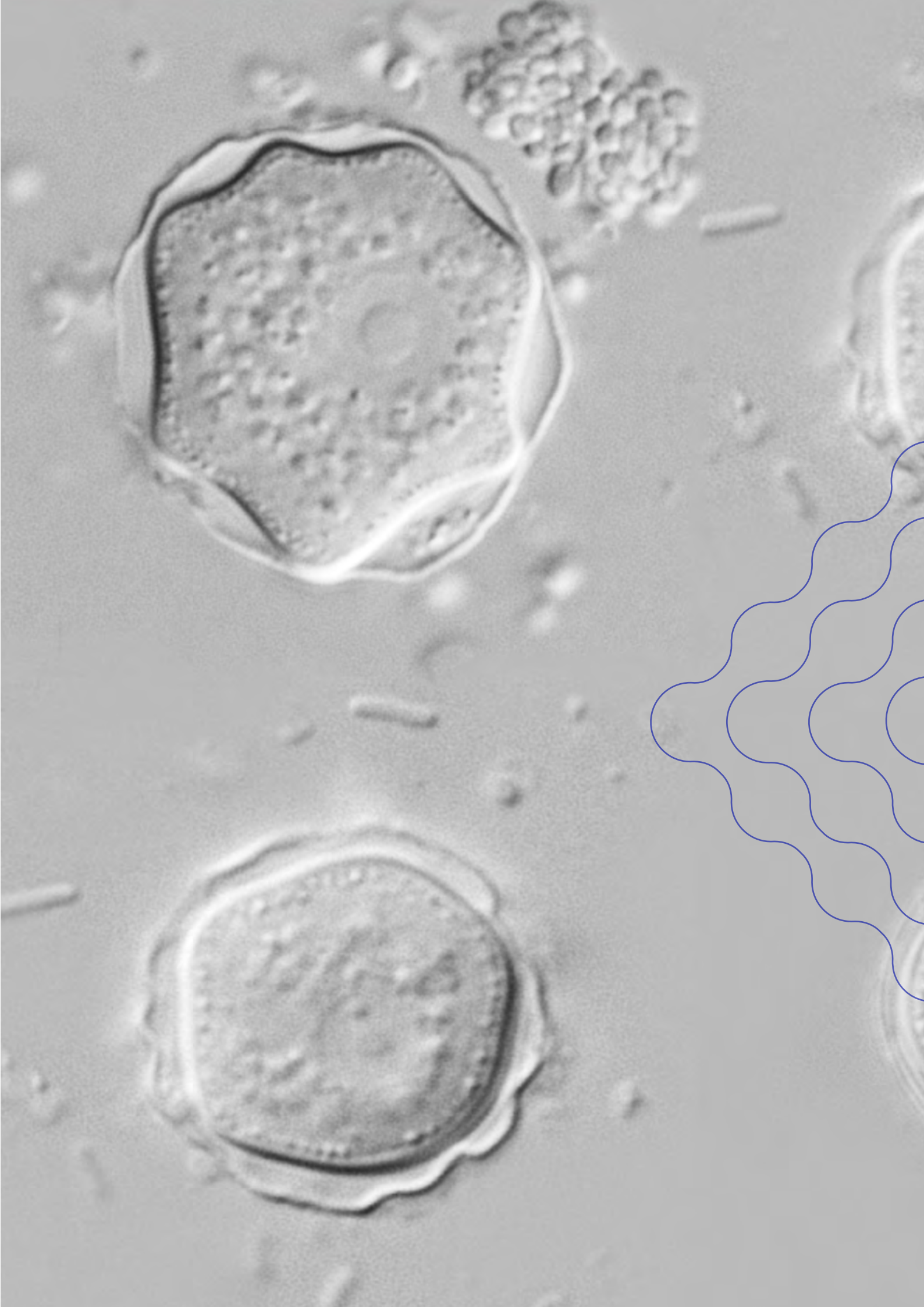
A la luz insistente del atardecer cubano, el anciano científico se acordaba de todo aquello. Se acordaba también de que, tras la derrota republicana en la Guerra Civil Española, la JAE fue desmantelada. Para entonces, Pittaluga ya había abandonado el país. El fallecimiento de su maestro y amigo, Cajal —en 1934—, y la inestabilidad amenazante de un futuro incierto lo alejaron de España. Primero, en dirección a Francia. Luego, cruzando el Atlántico, para llegar a Argentina e instalarse definitivamente en La Habana, unos años después.

De las cenizas del recuerdo de la JAE y de parte de su estructura organizativa nació el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, el CSIC. Y a partir de éste se gestaron otros logros, de manos de otros científicos y de otros anhelos de un futuro mejor. Pero esa es otra historia.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., & Priotto, G. (2017). Human african trypanosomiasis. *The Lancet*, 390(10110), 2397-2409.
2. Corral-Corral, I., & Quereda Rodríguez-Navarro, C. (2012). Gustavo Pittaluga y la expedición para el estudio de la enfermedad del sueño en los territorios españoles del golfo de Guinea (1909). *Rev. neurol.* (Ed. impr.), 49-58.
3. Ehrlich, B. (2017). *The Dreams of Santiago Ramón y Cajal*. Oxford University Press.
4. Kennedy, P. G. (2008). The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 64(2), 116-126.
5. de las Mercedes Bosch-González, L., Cobas, A. B., Ferrier, V. S., Peralta, T. G., & Cañete, A. M. T. (2014). Dr. Gustavo Pittaluga Fattorini. In memoriam. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13(1), 11-19.
6. Naranjo Orovio, C., & Fernández Prieto, L. (2003). El exilio científico en Cuba: el caso de Gustavo Pittaluga.
7. Rodríguez, J. Á. G., Núñez, J. G., & Prieto, J. P. (Eds.). (2006). *Santiago Ramón y Cajal, bacteriólogo*. Ars Medica.





# REVISIONES

## A M P L I A S

**Carmen Martínez Fernández**

Importancia clínico-epidemiológica de  
*Acanthamoeba* y *Legionella* en el ámbito hospitalario

**Cynthia Machín Pérez**

Lucha contra los nematodos gastrointestinales en  
pequeños rumiantes: desafíos y métodos de control

**Samantha Moratal Martínez**

A review of emerging zoonotic parasites in marine fish

**Belén González Bertolín**

Revisión de helmintosis olvidadas y emergentes

**Manuel Lacueva Arnedo**

Historia y evolución del tratamiento frente a  
*Trichomonas vaginalis*

**Blanca Tristán Escudero**

Hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis* tras el uso de  
inmunosupresores en la terapia frente al SARS-CoV-2

**Cecilia María Vallejo León**

*BLASTOCYSTIS* SPP.

**Juan Carlos Manzano Ayuso**

Meningoencefalitis amebiana primaria causada por  
la ameba "come-cerebros" *Naegleria fowleri*

# IMPORTANCIA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE *ACANTHAMOEBA* Y *LEGIONELLA* EN EL ÁMBITO HOSPITALARIO

## 1. REVISIÓN

### 1.1. AMEBAS DE VIDA LIBRE

- 1.1.1 Historia de *Acanthamoeba*
- 1.1.2 Taxonomía y clasificación de *Acanthamoeba*
- 1.1.3 Morfología de *Acanthamoeba*
- 1.1.4 Ciclo biológico de *Acanthamoeba*
- 1.1.5 Distribución y epidemiología de *Acanthamoeba*
- 1.1.6 Patogénesis, diagnóstico y tratamiento de *Acanthamoeba*
  - I. 1.6. 1. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)
    - I. 1.6. 1. 1. Características de la EGA
    - I. 1.6. 1. 2. Diagnóstico de la EGA
    - I. 1.6. 1. 3. Tratamiento de la EGA
  - I. 1.6. 2. Infección cutánea por *Acanthamoeba*
    - I. 1.6. 2. 1. Características de la amebiasis cutánea
    - I. 1.6. 2. 2. Diagnóstico de la amebiasis cutánea
    - I. 1.6. 2. 3. Tratamiento de la amebiasis cutánea
  - I. 1.6. 3. Queratitis amebiana (QA)
    - I. 1.6. 3. 1. Características de la QA
    - I. 1.6. 3. 2. Diagnóstico de la QA
    - I. 1.6. 3. 3. Tratamiento de la QA
  - I. 1.6. 4. Neumonía por *Acanthamoeba*
    - I. 1.6. 4. 1. Características de la neumonía por *Acanthamoeba*
    - I. 1.6. 4. 2. Diagnóstico de la neumonía por *Acanthamoeba*
    - I. 1.6. 4. 3. Tratamiento de la neumonía por *Acanthamoeba*

- 1.1.7 Detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales
- 1.1.8 Prevención y control de *Acanthamoeba*
- 1.1.9 Papel vectorial de *Acanthamoeba*
  - I. 1.9. 1. Interacción (*Acanthamoeba*-*Legionella*)

### 1.2. LEGIONELLA

- 1.2.1 Historia de *Legionella*
- 1.2.2 Taxonomía y clasificación de *Legionella*
- 1.2.3 Ciclo biológico de *Legionella*
- 1.2.4 Distribución y epidemiología de *Legionella*
- 1.2.5 Patogénesis de *Legionella*
  - I. 2.5.1. Fiebre de Pontiac
    - I. 2.5.1.1. Características de la fiebre de Pontiac
    - I. 2.5.1.2. Diagnóstico de la fiebre de Pontiac
    - I. 2.5.1.3. Tratamiento de la fiebre de Pontiac
  - I. 2.5.2. Enfermedad del legionario
    - I. 2.5.2.1. Características de la enfermedad del legionario
    - I. 2.5.2.2. Diagnóstico de la enfermedad del legionario
    - I. 2.5.2.3. Tratamiento de la enfermedad del legionario
- 1.2.6 Detección de *Legionella* en muestras ambientales
- 1.2.7 Prevención y control de *Legionella*

## 2. BIBLIOGRAFÍA

# 1 REVISIÓN

## 1.1. AMEBAS DE VIDA LIBRE

Las Amebas de Vida Libre (AVL) son protozoos eucariotas aeróbicos consideradas amebas anfitriónicas ya que son capaces de existir como organismos de vida libre en la naturaleza y de infectar tanto al hombre como a los animales viviendo como parásitos en su interior (Page, 1967).

*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* son algunas de estas amebas que causan patologías en humanos, produciendo, entre otras, infecciones en el sistema nervioso central (SNC). *Acanthamoeba* y *Balamuthia* pueden causar infecciones pulmonares y cutáneas, así como encefalitis amebiana granulomatosa de forma crónica (EGA), sobre todo en individuos inmunocomprometidos. Por su parte, *N. fowleri* puede causar una meningoencefalitis aguda, fulminante, necrotizante y hemorrágica (PAM) en individuos inmunocompetentes. Por otro lado, *Acanthamoeba* también puede causar queratitis amebiana (QA) llegando a invadir la córnea y dando como resultado ceguera (Martinez and Visvesvara, 1997; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

“*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* son algunas de estas amebas que causan patologías en humanos, produciendo, entre otras, infecciones en el sistema nervioso central (SNC).”

### 1.1.1. Historia de *Acanthamoeba*

En 1913, Puschkarew aisló desde una muestra de polvo una ameba capaz de formar quistes con las características típicas de lo que ahora se conoce como el género *Acanthamoeba*, dándole el nombre científico de *Amoeba polyphagus*. En 1930, Aldo Castellani aisló de un cultivo de *Cryptococcus parvulus* una AVL a la que Douglas denominó *Hartmannella castellani*, que fue posteriormente reclasificada como *Acanthamoeba castellanii* (Puschkarew, 1913; Castellani, 1930; Douglas, 1930; Martinez and Visvesvara, 1997).

A partir de 1958 estas amebas empezaron a cobrar mayor importancia, ya que fue Culbertson quien describió una meningoencefalitis producida por *Acanthamoeba*, al descubrir una ameba que había contaminado un cultivo celular durante el desarrollo de la vacuna de la poliomielitis. Culbertson inoculó esta ameba en ratones y monos tratados con cortisona, y comprobó la presencia de estas amebas en las lesiones producidas en los cerebros de los animales fallecidos a la semana de inoculación, creando la hipótesis de lo que podría estar ocurriendo de forma similar en humanos. Posteriormente, esta ameba se denominó *A. culbertsoni* (Culbertson, Smith and Minner, 1958; Culbertson et al., 1959). En 1965, Fowler y Carter reconocieron los primeros casos de meningoencefalitis en humanos producidos por una AVL, encontrando una ameba diferente a *Acanthamoeba* capaz de producir la muerte del paciente, a la que Culbertson et al. denominaron *N. fowleri* (Fowler and Carter, 1965). Al año siguiente, en 1966, en EE. UU., Butt acuñó el término de meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) para esta enfermedad producida por *N. fowleri* (Butt, 1966; Martinez and Visvesvara, 1997).

A partir de 1972 el interés por estas amebas aumentó en todo el mundo, tras conocerse el primer caso claro de EGA y de queratitis en humanos producida por *Acanthamoeba* (Jager and Stamm, 1972; Jones, Visvesvara and Robinson, 1975), unido a la asociación de las AVL con otros agentes patógenos, el descubrimiento de bacterias endosimbiontes en su interior, y la capacidad de estas amebas de actuar como reservorio de *Legionella pneumophila* (Drozanski, 1956; Rowbotham, 1980; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012). En la Figura 1 se puede observar el crecimiento exponencial de las publicaciones de interés relacionadas con *Acanthamoeba* a lo largo de los años, llegando a un total de 5.890 publicaciones en la actualidad.

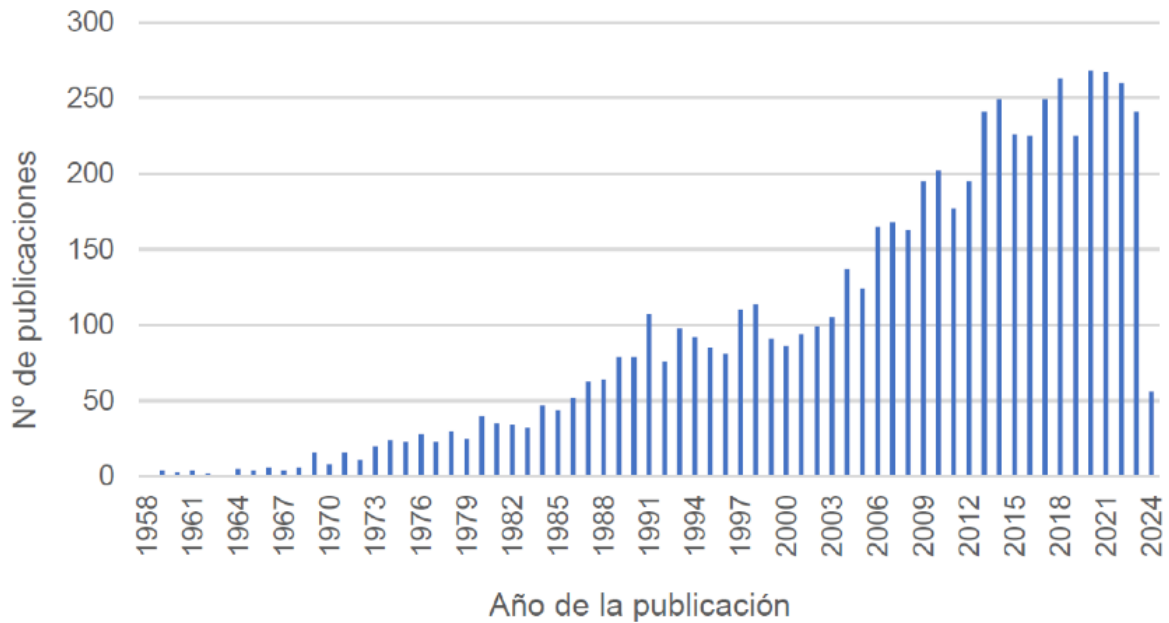


Figura 1. Número de publicaciones recogidas en PubMed desde 1958 hasta 2024 relativas al estudio de *Acanthamoeba*.

### 1.1.2. Taxonomía y clasificación de *Acanthamoeba*

La clasificación taxonómica clásica embarcaba a las AVL como protozoos dentro del grupo *Sarcodina*. Esta taxonomía fue abandonada y se centraron en los aspectos morfológicos, bioquímicos y en la filogenia molecular; de esta manera se reclasificaron en dos supergrupos (Figura 2) (Adl et al., 2005; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Adl et al., 2019).

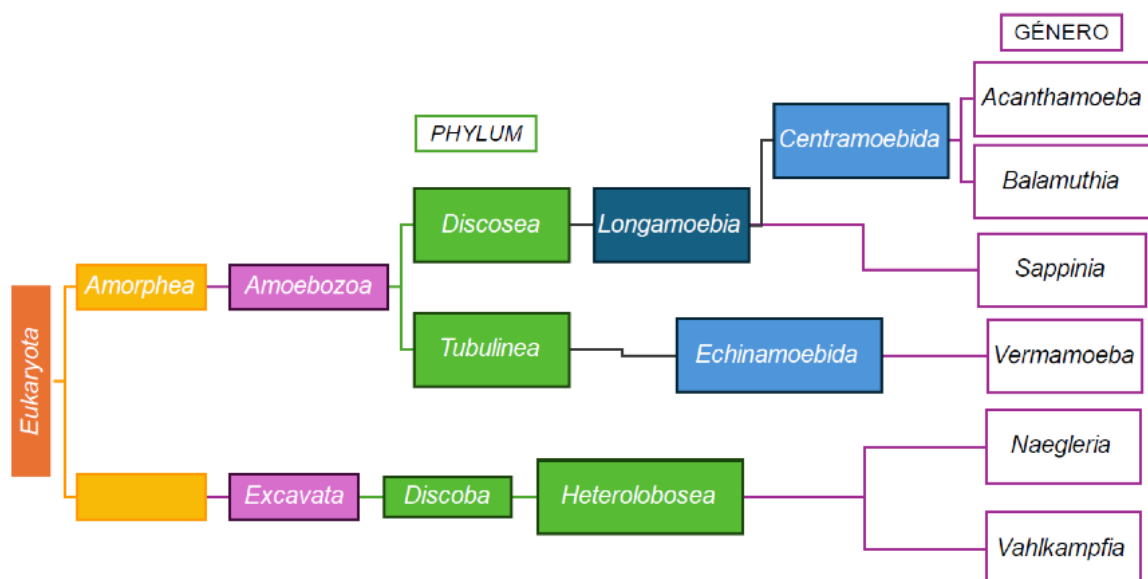
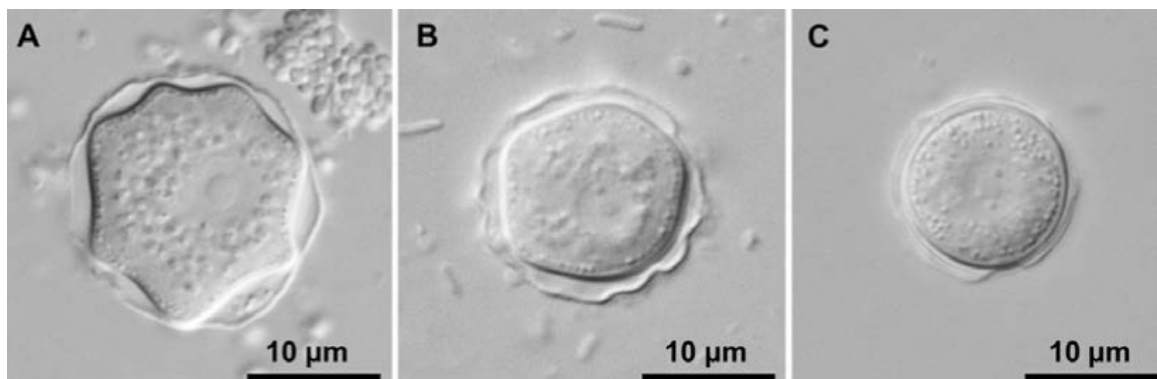


Figura 2. Clasificación taxonómica de las Amebas de Vida Libre por Adl et al. (2019).

Inicialmente, Pussard (1977) clasificó el género de *Acanthamoeba* en 20 especies, divididas en 3 grupos (I-III) basándose en el tamaño y morfología del quiste (Figura 3):

- **Grupo I:** este grupo se caracteriza por que los quistes poseen un diámetro superior o igual a 18  $\mu\text{m}$  y una notable separación entre la pared externa e interna del quiste, siendo la pared externa ligeramente arrugada o lisa, y la interna a menudo en forma de estrella. Este grupo incluye hasta 5 especies de *Acanthamoeba*, entre ellas: *A. astronyxis* o *A. comandoni* (Pussard, 1977; Kong, 2009).
- **Grupo II:** en este grupo los quistes son más pequeños, con un diámetro inferior a 18  $\mu\text{m}$ . La pared externa del quiste está ondulada, y la pared interna puede presentar diversas formas. Estas paredes suelen estar separadas, pero en algunas ocasiones están estrechamente unidas. La mayoría de las *Acanthamoeba* patógenas pertenecen a este grupo, entre ellas: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, o *A. griffinii* (Pussard, 1977; Kong, 2009; Corsaro, 2020).
- **Grupo III:** los quistes de este grupo también son pequeños, con un diámetro medio inferior a 18  $\mu\text{m}$ . La pared interna es redonda o ligeramente angular difícil de observar, mientras que la externa es fina y está próxima a la interna. En la actualidad, han sido claramente nombradas ocho especies en este grupo, como, por ejemplo: *A. culbertsoni* o *A. jacobsi* (Pussard, 1977; Kong, 2009; de Lacerda and Lira, 2021).



**Figura 3.** Quistes de *Acanthamoeba* visualizados por microscopía de contraste de interferencia. Clasificación morfológica de los quistes: A) Grupo morfológico I, B) Grupo morfológico II, C) Grupo morfológico III. (Figura tomada de Lorenzo-Morales et al. con pequeñas modificaciones [2015]).

Esta clasificación tiene limitaciones, ya que la morfología de los quistes de *Acanthamoeba* puede variar dependiendo del medio de cultivo utilizado; por lo tanto, ha sido sustituida actualmente por técnicas de biología molecular, mejorando así la identificación de las especies de *Acanthamoeba*, principalmente mediante el análisis de la subunidad pequeña 18S del gen del ADN ribosómico (18S-ADNr) (Stothard et al., 1998; Walochnik, Scheikl and Haller-Schober, 2015).

De esta manera, las especies de *Acanthamoeba* se clasifican actualmente en 23 genotipos (T1-T23), siendo el genotipo T4 el más prevalente en el mundo, seguido del T3, T15, T11, y T5 (Walochnik, Scheikl and Haller-Schober, 2015).

Los genotipos más relacionados con la patogenicidad y enfermedades en humanos son el genotipo T4, seguido del T3, siendo las especies del genotipo T4 las que han sido aisladas en un mayor número de casos clínicos de EGA y queratitis. En concreto, destacan los genotipos T1, T2, T4, T5, T10, T12, y T18 implicados en casos de EGA y los genotipos T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11, T12, y T15 en casos de QA (Stothard et al., 1998; Wang et al., 2023).

Por otra parte, las especies de *Balamuthia* y de *Naegleria* capaces de infectar al hombre son: *N. fowleri* como agente causal de la PAM y *B. mandrillaris* causante de EGA. Se ha descrito recientemente una nueva especie de *Balamuthia* (*B. spinosa*) capaz de actuar como vector de *Legionella*, pero de la que actualmente se desconoce si es capaz de producir patología en el hombre (Lotonin et al., 2022). Por otro lado, se han descrito otras AVL relacionadas de forma puntual con patologías humanas, como *Sappinia* spp. responsable de encefalitis amebiana y *Vermamoeba vermiformi* y *Vahlkampfia* causantes de casos de daño ocular (Niyayati et al., 2010; Arnalich-Montiel et al., 2013b; Mungroo et al., 2022; Otero-Ruiz et al., 2022).

### 1.1.3. Morfología de *Acanthamoeba*

*Acanthamoeba* posee dos estados morfológicos durante su ciclo de vida: un estado vegetativo denominado trofozoíto y un estado latente de resistencia frente a condiciones adversas, el quiste (Figura 4) (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

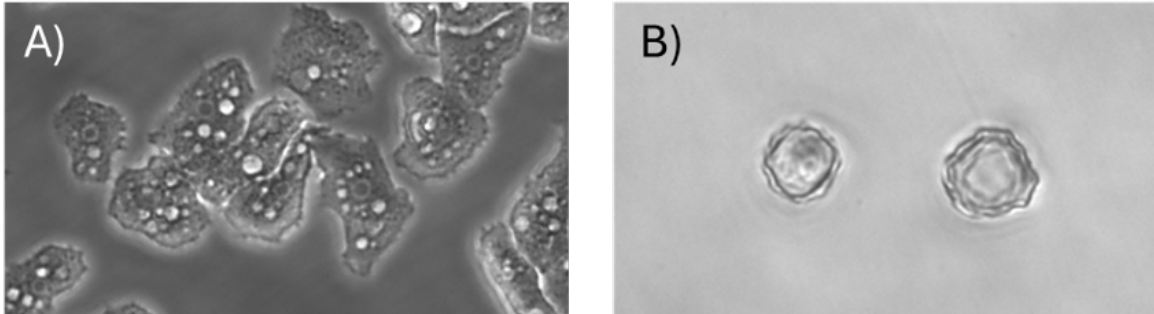


Figura 4. Estados morfológicos de *Acanthamoeba*. A) Trofozoítos de *Acanthamoeba* B) Quistes de *Acanthamoeba*, visualizados por microscopía de contraste de interferencia. (Figura original, capturada en los laboratorios de la Facultad de Farmacia de la Universidad de California, San Diego).

Los trofozoítos miden entre 15 - 45  $\mu\text{m}$  según la especie de *Acanthamoeba*, pueden tener forma alargada, ovalada o irregular. Están rodeados por una membrana plasmática, de la cual surgen pseudópodos con forma fina, cónica y espinosa, denominados acantopodios, dando así a la célula un aspecto característico; estos acantopodios participan en la alimentación, en el movimiento de la ameba y en su capacidad para adherirse a superficies de contacto (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Mungroo et al., 2022).

El interior celular está compuesto por mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, un único núcleo con un nucleolo central grande y densamente teñido, y diferentes tipos de vacuolas. Estas vacuolas pueden ser contráctiles implicadas en la regulación osmótica, o digestivas responsables de la descomposición de las partículas; además pueden existir lisosomas y vacuolas con glucógeno (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Wang et al., 2023).

Cuando estos trofozoítos se ven expuestos a condiciones desfavorables, como temperaturas, pH extremo, alta osmolaridad, o falta de nutrientes, esta ameba se redondea y enquistas. Al recuperar las condiciones favorables para su crecimiento, la ameba es capaz de abandonar la forma quística y recuperar el estado de trofozoíto (Page, 1967; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

El quiste posee una forma redondeada más compacta que mide entre 10-25  $\mu\text{m}$  según la especie. Los quistes son uninucleados con un nucleolo denso; estas estructuras están rodeadas de una doble pared, lo que les confiere una gran resistencia a las condiciones ambientales, fisiológicas, químicas y radiológicas adversas, así como a algunos fungicidas, agentes desinfectantes y antibióticos. Los quistes de *Acanthamoeba* pueden llegar a sobrevivir hasta 20 años sin perder su virulencia, resistiendo a las diversas condiciones adversas (Mungroo et al., 2022; Wang et al., 2023).

“*Acanthamoeba* posee dos estados morfológicos durante su ciclo de vida: un estado vegetativo denominado trofozoíto y un estado latente de resistencia frente a condiciones adversas, el quiste

”

La doble pared quística está compuesta por un ectoquiste externo arrugado, con pliegues y ondulaciones, compuesto por proteínas y lípidos; esta capa laminar fibrosa llega a tener un grosor de 0,3-0,5  $\mu\text{m}$ . La pared interna denominada endoquiste está compuesta principalmente de celulosa y posee una forma variable, pudiendo ser estrellada, poligonal, oval, esférica, etc. (Bowers and Korn, 1969; Mungroo et al., 2022).

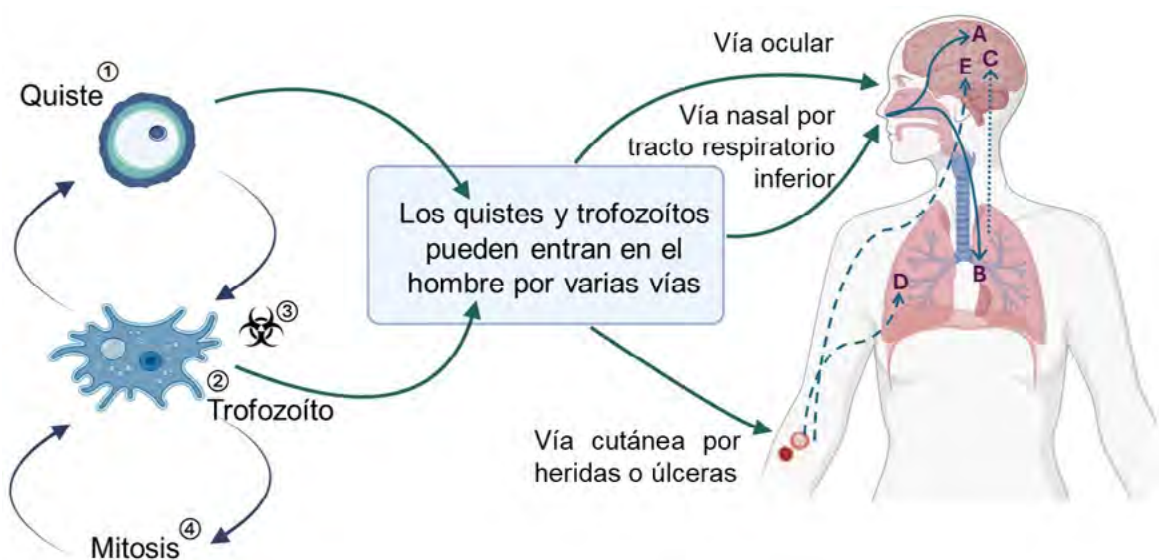
La pared del endoquiste le confiere una elevada resistencia, sirviendo de componente estructural, debido a su composición por moléculas de celulosa que le dan estructura cristalina. Esta celulosa se ensambla produciendo fibrillas elementales o protofibrillas que, a su vez, forman microfibrillas. Teniendo en cuenta la estructura de la celulosa y su ensamblaje hace prácticamente imposible que ninguna enzima sea capaz de unirse a ella. Esto, unido a la asociación con otros polímeros, hace que esta pared sea resistente y robusta ante la degradación, actuando como barrera estructural y protectora (Lynd et al., 2002; Wang et al., 2023).

#### 1.1.4. Ciclo biológico de *Acanthamoeba*

*Acanthamoeba* spp. es capaz de vivir en el medio ambiente de forma ubicua, encontrándose en el suelo, sobre alimentos cultivados en el campo, en cultivos de células de mamíferos, y en ecosistemas acuáticos tanto naturales como artificiales (CDC, 2019).

El trofozoíto es la forma activa y móvil que fagocita los nutrientes del ambiente procedentes de otros microorganismos; también puede vivir en un medio axénico rico en nutrientes e ingerirlos por pinocitosis. Este se replica por mitosis, y, en condiciones adversas, se enquista (Figura 5) (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

Los trofozoítos son las formas infecciosas, aunque tanto los quistes como los trofozoítos pueden entrar en el organismo por diversas vías. Al entrar por las fosas nasales, tracto respiratorio inferior o la piel ulcerada o con heridas, pueden llegar a invadir el SNC por diseminación hematogena, atravesando la barrera hematoencefálica, causando la EGA. Por otro lado, estas amebas en contacto con heridas o la piel ulcerada pueden producir lesiones cutáneas en individuos con el sistema inmunitario comprometido. Tanto los quistes como los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. se pueden encontrar en los tejidos, pero solo los trofozoítos son capaces de producir el daño tisular. Además, estas amebas pueden entrar en el hombre a través de los ojos, produciendo queratitis grave en personas sanas, sobre todo en usuarios de lentes de contacto. Es importante destacar que no se ha descrito diseminación hematogena cuando la vía de entrada es la ocular (Figura 5) (CDC, 2019; Mungroo et al., 2022).



**Figura 5.** Ciclo biológico de *Acanthamoeba*. *Acanthamoeba* puede encontrarse en su forma de quiste (1) o de trofozoíto (2), forma infectante (3), que se divide por mitosis (4). El contacto con el cuerpo humano puede ser por varias vías: ocular, respiratoria, o cutánea. La diseminación por el epitelio neuro-olfativo puede alcanzar el cerebro (A), y a través de la inhalación alcanzar el pulmón (B). La diseminación hematogena a otros órganos puede ocurrir desde los pulmones al cerebro (C) y desde la piel dañada al pulmón (D) o al cerebro (E), llegando a producir las diferentes enfermedades infecciosas. Creado con BioRender.com.

### 1.1.5. Distribución y epidemiología de *Acanthamoeba*

*Acanthamoeba* es capaz de vivir casi en cualquier ambiente, debido a sus características de supervivencia. Tiene una amplia distribución en la naturaleza, encontrándose sobre todo en el suelo y en todo tipo de ecosistemas acuáticos, tanto artificiales como naturales, (aguas dulces y salobres, aguas residuales, piscinas, suministros de lentes de contacto, torres de refrigeración, humidificadores, cabezales de ducha, bañeras de hidromasaje, sistemas de calefacción, conductos de ventilación, aire acondicionado, agua del grifo, etc.). *Acanthamoeba* se ha encontrado en diferentes ecosistemas de forma ubicua en todos los continentes (Figura 6) (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

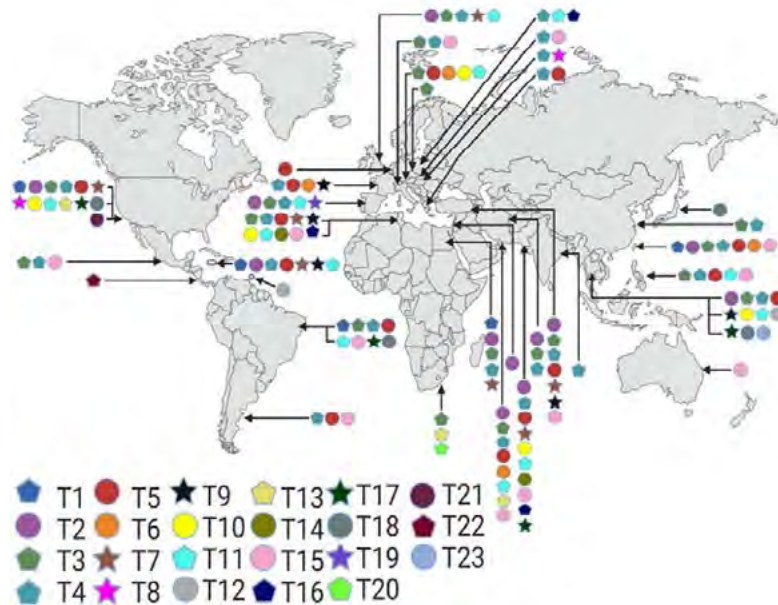


Figura 4. Distribución geográfica de *Acanthamoeba* spp. según los genotipos (T1-T23) y su morfología. Grupo I: ★; Grupo II: ▲; Grupo III: ●, según la relación morfológica de los quistes (Figura tomada de Otero-Ruiz et al. [2022]).

Esta ameba se ha llegado a encontrar en el suelo y agua de los hospitales, en las unidades de irrigación dental, en las unidades de diálisis y en las estaciones de lavado de ojos. Por otra parte, se ha conseguido aislar en los cultivos de células bacterianas, fúngicas y de mamíferos, y en diferentes muestras humanas como secreciones del oído, secreciones pulmonares, hisopos obtenidos de la mucosa nasofaríngea de pacientes con afecciones en los senos maxilares, autoinjertos mandibulares y muestras de heces. Además, se han aislado varias especies de *Acanthamoeba* procedentes del cerebro, de tejidos pulmonares, lesiones cutáneas, biopsias de la córnea, líquidos cefalorraquídeos y necropsias de individuos infectados (Martinez and Visvesvara, 1997; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

El cambio climático y la globalización puede estar afectando a su distribución, debido a ello los nichos ambientales de las AVL se han ido ampliando y como consecuencia el contacto con el hombre, afectando a la interacción y transmisión de estos parásitos y a la susceptibilidad de los hombres a estos, y de ahí su importancia en la salud pública. Hay que tener en cuenta que estos cambios cada día son más frecuentes por lo que se necesita una actualización constante de los estudios epidemiológicos (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Lorenzo-Morales et al., 2013a; Kofman and Guarner, 2022).

“ El cambio climático y la globalización puede estar afectando a su distribución ”

Una evidencia de que estos organismos están presentes en nuestro entorno y en continuo contacto con el ser humano, es la presencia de una elevada seroprevalencia en la población. En un estudio realizado en Nueva Zelanda se detectaron anticuerpos anti-*Acanthamoeba* en el 100% de los individuos sanos estudiados. En otro estudio semejante realizado en Londres, se observó una seroprevalencia del 85% en individuos procedentes de diferentes países (Cursons et al., 1980; Brindley, Matin and Khan, 2009; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

En España, estudios ambientales de aguas de la Comunidad de Madrid han demostrado la presencia de *Acanthamoeba* en las aguas de la entrada y salida de las Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) y en cuencas naturales, sugiriendo que los tratamientos de desinfección empleados no son suficientes para la eliminación de estas amebas. Además, como consecuencia de estos estudios se ha descrito por primera vez, en las ETAP de esta región central de España, la presencia del genotipo T5 de *Acanthamoeba* spp., y del genotipo T19 a nivel mundial (Magnet et al., 2012; Magnet et al., 2015; Gomes et al., 2020).

Los estudios más recientes en España han detectado la presencia de *Acanthamoeba* en otro tipo de muestras. En la Comunidad de Madrid cabe destacar la presencia del genotipo T2 y T4 en gatos callejeros inmunodeprimidos (Montoya et al., 2018). Estudios en las Islas Canarias encontraron *Acanthamoeba* en diferentes tipos de animales: en ardillas salvajes (Lorenzo-Morales et al., 2007), en dos perros domésticos con queratitis y ascitis/peritonitis y en un perro con inflamación de próstata (Lorenzo-Morales et al., 2013b; Valladares et al., 2015). Otros estudios realizados en estas Islas, mostraron la supervivencia de *Acanthamoeba* en suelos agrícolas áridos, con una detección del 30% en el agua de riego (Reyes-Battle et al., 2021 a), también se aisló en un 37,7% en muestras de suelo y en un 42% en muestras de arena de la playa (Lorenzo-Morales et al., 2005b). En Valencia se ha descrito esta ameba en el 65,5% sobre verduras y frutas que se consumen crudas (Moreno-Mesonero et al., 2023).

Actualmente las infecciones por AVL poseen una mayor importancia debido a que han aumentado como causa de muerte parasitaria en todo el mundo. Los pacientes más susceptibles de adquirir enfermedades causadas por *B. mandrillaris* o *Acanthamoeba* son los pacientes diabéticos o con inmunodeficiencias, así como los pacientes trasplantados o con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Duggal et al., 2017; Omaña-Molina et al., 2017). Sin embargo, en muchas ocasiones el diagnóstico de estas enfermedades no llega a ser realizado, de hecho, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC) estima que muchos casos de meningoencefalitis no diagnosticados en EE. UU. se deben a infecciones por *N. fowleri* (Kofman and Guarner, 2022). En cuanto a la incidencia de la EGA, no existen datos estadísticos adecuados procedentes de los sistemas de vigilancia, la atención sanitaria o de las autopsias. Sin embargo, se ha observado en algunos estudios cómo la enfermedad afecta sobre todo a hombres y en edades comprendidas entre los 20 y 40 años, siendo la tasa de supervivencia baja, con una tasa de mortalidad aproximada de 1,57 muertes por EGA comparándolo por cada 10.000 muertes por el VIH en EE. UU. (Da Rocha-Azevedo, Tanowitz and Marciano-Cabral, 2009; Duggal et al., 2017; Kalra et al., 2020; Mungroo et al., 2022).

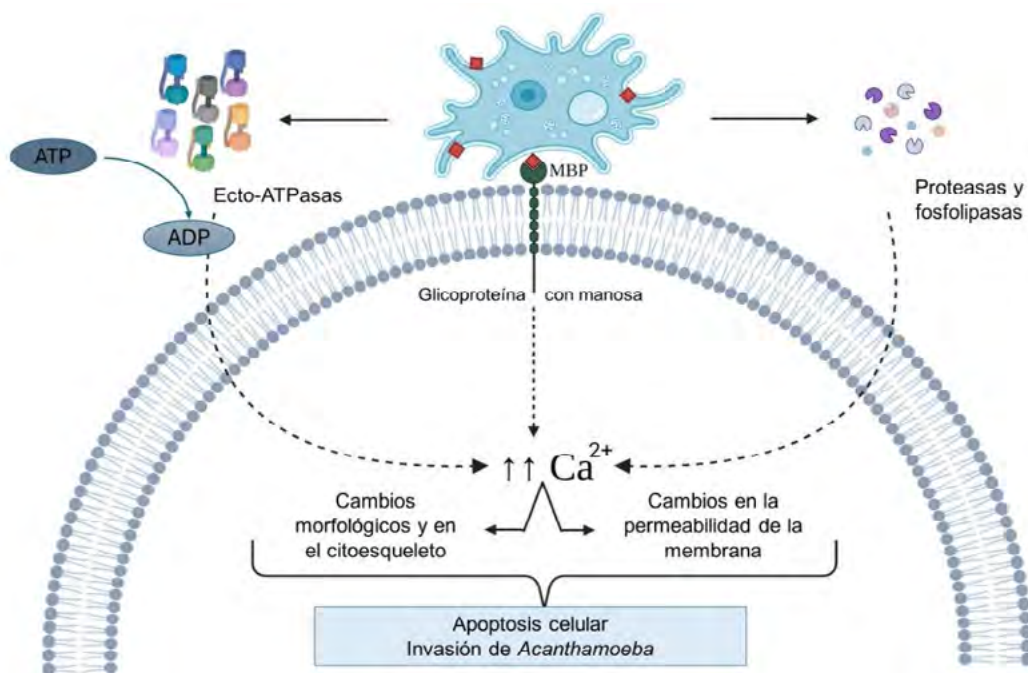
“ En España, estudios ambientales de aguas de la Comunidad de Madrid han demostrado la presencia de *Acanthamoeba* en las aguas de la entrada y salida de las Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) y en cuencas naturales, sugiriendo que los tratamientos de desinfección empleados no son suficientes para la eliminación de estas amebas. ”

**H**oy en día, la QA se ha convertido en un importante foco de atención debido a su repercusión en la salud humana, cuando antes era conocida como una infección poco frecuente. La tasa de incidencia de esta infección en todo el mundo varía debido a factores como: la presencia de *Acanthamoeba* en el agua doméstica, la dureza del agua, el mal uso de lentes de contacto y de la solución multiuso para dichas lentes. Los estudios han determinado, que por ejemplo, la India posee la mayor incidencia con 15,2 casos por millón de personas al año, seguida de Nueva Zelanda, Egipto, Portugal y el Reino Unido, con 5,2; 5; 4,5 y 4,3 casos por millón de personas al año respectivamente; por otra parte, el alcance varía según los diferentes países, la tasa de incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto oscila entre 0,01 y 1,49 por 10.000 usuarios (Khan, 2006; Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015; Mungroo et al., 2022; Liu et al., 2023).

### 1.1.6. Patogénesis, diagnóstico y tratamiento de *Acanthamoeba*

El primer paso crítico en la patogénesis de *Acanthamoeba* es la adhesión tras el contacto con piel, ojos o cualquier tipo de mucosa. Los trofozoítos son capaces de adherirse a las células a través de la expresión de una proteína transmembranal, conocida como proteína de unión a manosa (MBP), capaz de unirse a las glicoproteínas que contienen manosa en la célula del hospedador (Panjwani et al., 1997). Por otra parte, la matriz extracelular de la ameba posee una proteína de unión a laminina que podría estar implicada en esta adhesión. La presencia de estas adhesinas unido al número de acantópodos de la célula, constituyen la base de la infección por esta ameba (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

La unión de las glicoproteínas celulares a la MBP de la ameba, desencadena una cascada de señalización celular que provoca la liberación de diversas enzimas hidrolíticas (neuraminidasas, fosfolipasas, proteasas y metaloproteasas citotóxicas) a través de la exocitosis regulada por *Acanthamoeba*, que actúan conjuntamente para producir un potente efecto citopático en la célula hospedadora, este proceso conlleva un aumento del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ), produciendo cambios en el citoesqueleto, modificando la morfología celular, aumentando la permeabilidad de la membrana, degradando la matriz extracelular y finalmente produciendo la necrosis celular (Omaña-Molina et al., 2012; Castrillón and Orozco, 2013). Se conoce cómo *Acanthamoeba* produce además ecto-ATPasas hidrolizando el ATP a ADP el cual es capaz de unirse a la célula hospedadora produciendo un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$ , activando diferentes cascadas de señalización implicadas en la activación de la caspasa-3 y la neuraminidasa, desempeñando un papel clave en la ruptura de la barrera celular. Todo ello contribuye a la inducción de apoptosis en la célula hospedadora, produciendo la muerte celular programada de la misma (Figura 7) (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Castrillón and Orozco, 2013; Rayamajhee et al., 2022).



**Figura 7.** Unión de *Acanthamoeba* a la célula. Activación de la cascada de señalización celular, con la consecuente producción de ATPasas y enzimas hidrolíticas que provocan el aumento del calcio intracelular conduciendo a cambios morfológicos y la apoptosis de la célula hospedadora, permitiendo así la penetración de *Acanthamoeba*. ♦MBP: Proteína de unión a manosa (Figura modificada de Castrillón y Orozco [2013], creada con BioRender.com).

Por otro lado, la diseminación hematogena de *Acanthamoeba* parece estar mediada por la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina, alterando así las uniones entre células y como consecuencia permitiendo el paso a través de la membrana hematoencefálica y el SNC, debido a un aumento de la permeabilidad de dicha barrera. Los trofozoítos son capaces de sobrevivir generando una defensa mediante la producción de dos superóxidos dismutasas y alimentándose a través de unas proyecciones citoplasmáticas denominadas estomas ameboides (Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015; Kofman and Guarner, 2022).

Es conocido cómo la susceptibilidad del hospedador posee un papel muy importante en las infecciones por *Acanthamoeba*, ya que casi toda la población está en contacto con alguna de ellas a lo largo de su vida, y solo unas pocas personas realmente llegan a padecer enfermedades infecciosas causadas por este parásito. Esto se debe a la respuesta inmunitaria innata del hospedador, en donde inicialmente se activa el sistema del complemento que junto con los neutrófilos evitan la diseminación e invasión de *Acanthamoeba* (Pumidonming et al., 2011). Por otro lado, las células inflamatorias, concretamente los macrófagos, son capaces de eliminar quistes y trofozoítos por medio de la fagocitosis, siempre y cuando estén en presencia de determinados anticuerpos y citoquinas que permitan su activación, como son, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) y la interleucina-6 (IL-6), entre otras citoquinas. Hay que tener en cuenta que en las infecciones por *Acanthamoeba* también se genera una respuesta inmunitaria adaptativa con la producción de linfocitos T y anticuerpos (Marciano-Cabral and Toney, 1998; Hurt et al., 2003; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

A pesar de la lucha del sistema inmunitario (SI) contra *Acanthamoeba*, esta ameba puede llegar a producir, como se ha indicado previamente, enfermedades del SNC: EGA; infecciones cutáneas y de las mucosas, neumonía atípica y QA (Kofman and Guarner, 2022).

#### **1.1.6.1. Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA)**

##### **1.1.6.1.1. Características de la EGA**

*Acanthamoeba* es capaz de atravesar el SNC y producir la EGA; esta enfermedad se considera una enfermedad rara con una tasa de mortalidad superior al 90% a pesar de la baja incidencia que posee en el mundo. Los pocos casos que resultaron favorables se han asociado a un diagnóstico precoz y al inicio de una terapia combinada (Kalra et al., 2020; Kofman and Guarner, 2022).

Entre 1990 y 2020 se publicaron en PubMed alrededor de 75 casos de EGA causados por esta ameba. Esta enfermedad puede ser subaguda o crónica, y se caracteriza por producir en el inicio de la infección cefalea, febrícula, mareos, alucinaciones, o déficit neurológico que progresa empeorando estos síntomas e incluyendo alteraciones visuales, convulsiones, cambios de personalidad, confusión, parálisis de los nervios craneales, ataxia, letargo, rigidez y coma. La EGA se caracteriza por ser una enfermedad progresiva; aunque los síntomas pueden llegar a tardar semanas o meses en desarrollarse, en cuanto aparecen conducen a la muerte del paciente a los pocos meses de su aparición, debido al aumento de la presión intracraneal (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Kalra et al., 2020; Kofman and Guarner, 2022).

Por lo general, los individuos más susceptibles de padecer EGA son aquellos con un SI comprometido, como es el caso de los pacientes con el VIH, trasplantados, en tratamiento con inmunosupresores, con lupus eritematoso sistémico, o diabetes mellitus (Omaña-Molina et al., 2017). Además, pueden interferir otros factores como el uso excesivo de antibióticos, el alcoholismo crónico, la cirrosis hepática, la desnutrición, el embarazo, las quemaduras, las heridas o la radioterapia (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). No obstante, hay que destacar que se han descrito casos en algunos individuos inmunocompetentes en donde se ha tratado la enfermedad consiguiendo en alguna ocasión la supervivencia del paciente (Lackner et al., 2010; Sütçü et al., 2018; Chowdhury et al., 2023).

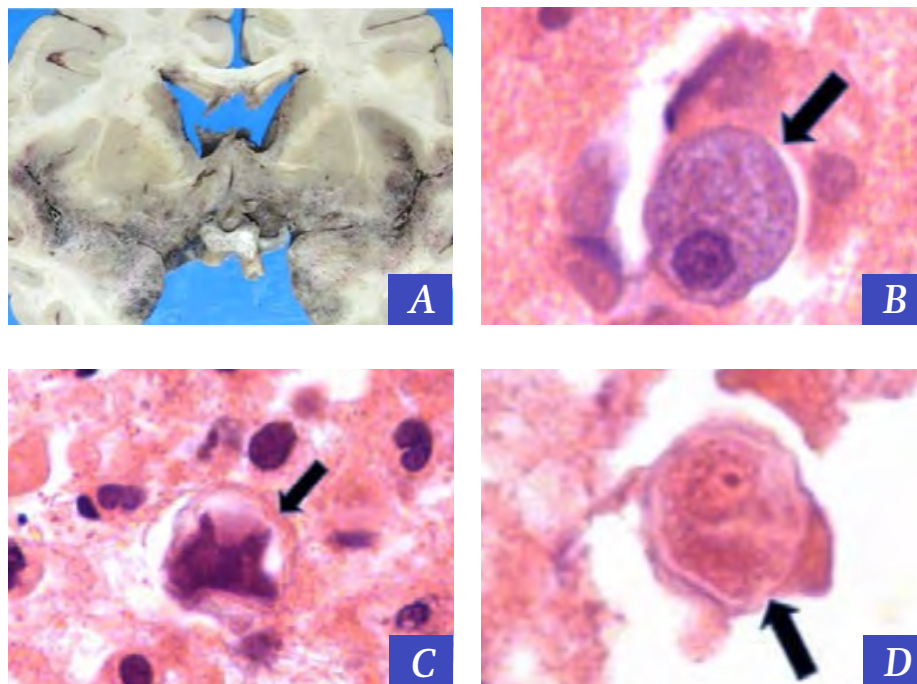
Recientemente se ha estudiado cómo los lavados nasales aumentan el riesgo de EGA, produciendo esta infección al entrar en contacto directo la ameba con los senos paranasales, ya que estos se realizan en numerosas ocasiones con el agua del grifo contaminada, en lugar de utilizar agua estéril (CDC, 2013; Cope, Roy and Ali, 2018; Haston and Cope, 2023).

### 1.1.6.1.2. Diagnóstico de la EGA

Los casos de EGA, en general, están infradiagnosticados, ya que requieren grandes conocimientos técnicos de laboratorio para poder realizar un diagnóstico precoz, y se necesita una fuerte sospecha clínica para realizar una buena intervención terapéutica (Wang et al., 2023).

El diagnóstico es difícil ya que rara vez se encuentran los trofozoítos o quistes en el líquido cefalorraquídeo (LCR), cuando esto ocurre, las amebas se pueden teñir con una tinción de Romanowsky, como Giemsa. Sin embargo, el diagnóstico precoz en el LCR puede realizarse con el recuento de leucocitos (linfocitos y monocitos), o de proteínas que se ven en aumento, además del análisis de los valores de la glucosa que están moderadamente bajos (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

Por otra parte, el diagnóstico de la EGA por resonancia magnética de cerebro muestra lesiones con realce anular que presentan una masa única o múltiples masas en la corteza cerebral. En el caso de poder realizar una biopsia de cerebro, estas muestras pueden ser estudiadas por histopatología en donde se observa un edema severo y necrosis hemorrágica. La prueba confirmatoria en este tejido se produce cuando se detectan los trofozoítos y los quistes en las zonas necrotizadas, además de un infiltrado inflamatorio granulomatoso con células multinucleadas, macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Figura 8). Dado que los trofozoítos pueden ser difíciles de distinguir de los macrófagos, los bloques de parafina pueden examinarse más a fondo utilizando técnicas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Además, niveles elevados de anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba* en el suero del paciente, pueden ser un indicativo de EGA (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Kofman and Guarner, 2022).



**Figura 8.** Infección cerebral por *Acanthamoeba*. A) Fotografía del cerebro con encefalitis granulomatosa amebiana, en la base se distingue una zona más afectada, con aspecto necrotizado. B) Trofozoito de *Acanthamoeba* en el parénquima cerebral. C y D) Quistes de *Acanthamoeba* en el tejido del parénquima cerebral (Figura modificada de Kofman and Guarner [2022]).

Durante varias décadas tras su descubrimiento, las infecciones por AVL se diagnosticaban mediante microscopía. Con la llegada de las pruebas de PCR, la microscopía dejó de considerarse el método de referencia y las pruebas moleculares se utilizaron para confirmar la enfermedad (Yagi, Schuster and Visvesvara, 2008; Kofman and Guarner, 2022). Como ocurre con muchas infecciones raras, los métodos de secuenciación están ganando prioridad en el diagnóstico. Algunos casos de EGA han sido diagnosticados o confirmados mediante estas técnicas capaces de detectar ADN en muestras de LCR, tejido y suero (Hirakata et al., 2021; Huang et al., 2021; Guan et al., 2022; Haston and Cope, 2023).

### 1.1.6.1.3. Tratamiento de la EGA

No existe un tratamiento recomendado frente a la EGA, diagnosticándose la mayoría de los casos post-mortem. Los tratamientos de las infecciones sistémicas en general dan resultados desiguales debido a que muchos de ellos no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que produce una tasa de mortalidad superior al 90% (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012).

Los pocos casos descritos en los que se pudo tratar la enfermedad con éxito implicaron el uso de alguno de los siguientes fármacos aislados o en combinación: ketoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isetionato de pentamidina, anfotericina-B, azitromicina, itraconazol o rifampicina. En 2013, la miltefosina fue reconocida por el CDC como fármaco recomendado frente a la EGA. Sin embargo, muchos de estos fármacos tienen efectos secundarios que a menudo limitan su uso, lo que produce que la mortalidad siga siendo elevada incluso entre los que reciben estos tratamientos. En 2018 se sugirió un nuevo fármaco, la nitroxolina, con la que se trató a un paciente que mejoró notablemente; pero este fármaco no está comercializado, ni en EE. UU. ni en España, para el tratamiento de ninguna enfermedad y su uso se considera exclusivamente en investigación (Laurie et al., 2018; Kangussu-Marcolino et al., 2019; Chao-Pellicer et al., 2023; Haston and Cope, 2023; Rodríguez-Expósito et al., 2023).

Por lo tanto, la búsqueda farmacológica frente a la EGA sigue en proceso, puesto que para que un fármaco sea óptimo para el tratamiento de la infección, no debe ser tóxico, debe tener no solo capacidad amebicida, sino también cisticida y ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Kangussu-Marcolino et al., 2019; Kofman and Guarner, 2022).

“ No existe un tratamiento recomendado frente a la EGA, diagnosticándose la mayoría de los casos post-mortem. ”

### 1.1.6.2. Infección cutánea por *Acanthamoeba*

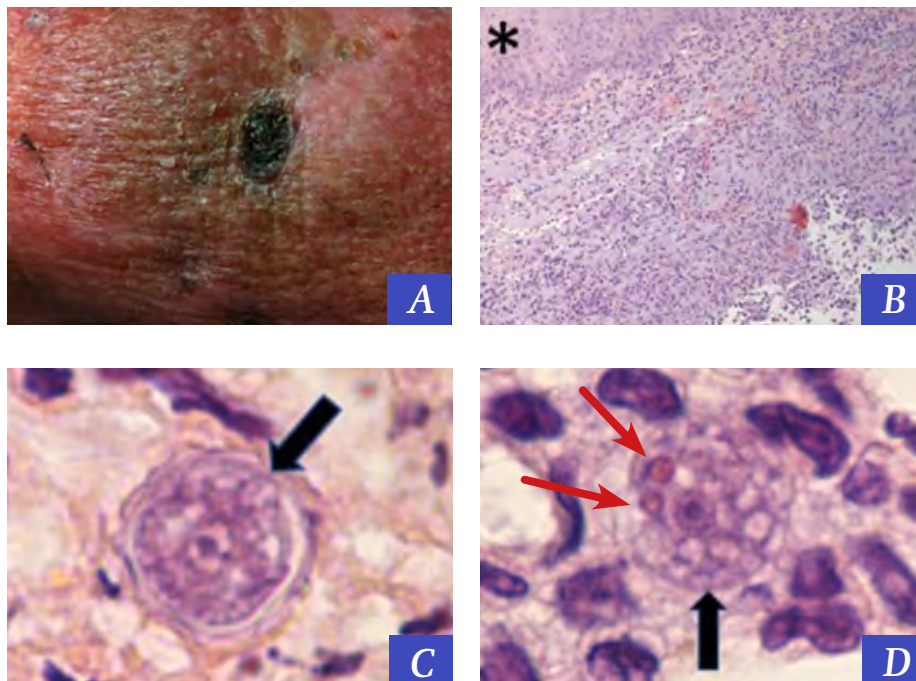
#### 1.1.6.2.1. Características de la amebiasis cutánea

La amebiasis cutánea es producida tanto por *Acanthamoeba* spp. como por *B. mandrillaris*. Esta enfermedad se ha descrito tanto en individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos, siendo la tasa de mortalidad por infección cutánea sin afectación del SNC de aproximadamente el 73%, mientras que la de la infección cutánea acompañada de enfermedad del SNC es aproximadamente del 100% (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Galarza et al., 2009).

La amebiasis cutánea se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones de tipo nodular, ulcerosas o necrotizadas; pudiendo observarse en ocasiones componentes pápulo-pustulosos o placas rojas induradas. En individuos inmunocomprometidos, la distribución de la infección cutánea suele ser generalizada; se han observado varios casos de afección en las extremidades inferiores y asociada con traumatismos. En casos aislados puede llegar a afectar a la mucosa nasofaríngea y senos respiratorios, principalmente en pacientes con SIDA que presentan engrosamiento de la mucosa de la cavidad nasal y signos y síntomas de sinusitis crónica (rinorrea, congestión y epistaxis); algunos de estos casos pueden llegar a diseminar a otras partes del organismo (Rivera and Padhya, 2002; Galarza et al., 2009; Kofman and Guarner, 2022).

### 1.1.6.2.2. Diagnóstico de la amebiasis cutánea

El diagnóstico de la infección cutánea puede ser un indicador precoz de la enfermedad diseminada producida por *Acanthamoeba*. Este se realiza principalmente mediante la biopsia tisular, siendo muy difícil su detección en el caso de no existir sospecha de exposición o contacto con *Acanthamoeba*, o el conocimiento de otra infección confirmada en otro lugar del cuerpo (encefalitis concurrente o infección diseminada). El examen histológico de las lesiones cutáneas suele mostrar focos de necrosis rodeados de células inflamatorias, vasculitis, trofozoítos y quistes; también puede observarse un infiltrado inflamatorio agudo con neutrófilos, y en los vasos sanguíneos de las lesiones pueden aparecer trombos. Sin embargo, hay que tener cuidado ya que este aspecto puede imitar el de la infección por hongos, virus y micobacterias, o al de la inflamación debida a un cuerpo extraño. El examen histológico de la biopsia se realiza con ácido de Schiff, tinción de calcoflúor o hematoxilina-eosina, pudiendo diferenciar los trofozoítos de los macrófagos gracias al interior celular, especialmente por la presencia de un cariosoma central redondo y grande junto con la cromatina dispersa de la ameba, frente a la cromatina agrupada típica de los macrófagos (Figura 9) (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Kofman and Guarner, 2022).



**Figura 9.** Infección cutánea por *Acanthamoeba*. A) Lesión necrótica ulcerada en la pierna. B) Tinción de hematoxilina-eosina del tejido infectado, \*zona engrosada. C) Tinción de hematoxilina-eosina: quiste de *Acanthamoeba* con pared externa arrugada (flecha negra). D) Tinción de hematoxilina-eosina: trofozoíto de *Acanthamoeba* con múltiples vacuolas (flecha negra) y dos eritrocitos (teñidos de rojo oscuro, flechas rojas) (Figura modificada de Kofman and Guarner [2022]).

Por otra parte, la identificación del género *Acanthamoeba* puede realizarse en los tejidos mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, espectrometría de masas (MALDITOF) o PCR del ADN mitocondrial o del ARNr 18S y genotipado, estos estudios solo se realizan en centros de referencia (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Kofman and Guarner, 2022).

“ El diagnóstico de la infección cutánea puede ser un indicador precoz de la enfermedad diseminada producida por *Acanthamoeba*. ”

### 1.1.6.2.3. Tratamiento de la amebiasis cutánea

Hoy en día, no existe un tratamiento establecido para la amebiasis cutánea. Los pacientes que han recibido tratamientos combinados han mostrado una mejoría, pero, en la mayoría de los casos, finalmente han fallecido, sobre todo en los casos en los que se produce diseminación al SNC. Los tratamientos que se han utilizado con cierto grado de éxito son: itraconazol, pentamidina intravenosa, 5-fluocitosina, clorhexidina y crema de ketoconazol. A pesar de la mejoría observada en numerosos pacientes tras recibir estos tratamientos, en muchos casos resultan tóxicos y no son 100% eficaces (Marciano- Cabral and Cabral, 2003).

### 1.1.6.3. Queratitis amebiana (QA)

#### 1.1.6.3.1. Características de la QA

En 1974, Naginton et al. describieron la queratitis causada por *Acanthamoeba* spp. (Naginton et al., 1975), desde entonces, se ha detectado en todo el mundo considerándose dentro del 2% de las infecciones que afectan a la córnea, asociándose con el uso de lentes de contacto (representando hasta el 95% de los casos notificados). Los síntomas clínicos de esta infección son: dolor ocular, enrojecimiento, visión borrosa, fotofobia, lagrimeo y sensación de un cuerpo extraño, pudiendo llegar a aparecer complicaciones oculares, como glaucoma secundario, atrofia del iris, cataratas y ceguera. En algunos casos han llegado a producirse inflamaciones de las diversas partes del ojo como la escleritis, uveítis, coriorretinitis y vasculitis retiniana (Figura 10) (Li et al., 2019; Kofman and Guarner, 2022; Wang et al., 2023).

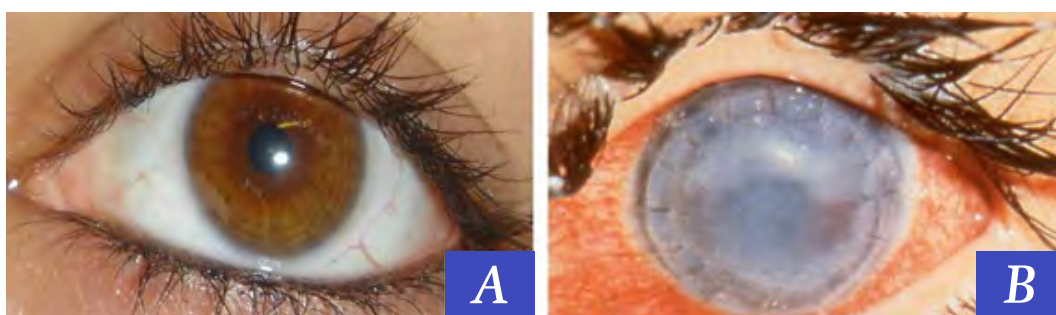


Figura 10. Infección ocular por *Acanthamoeba*. A) Ojo sin infección. B) Ojo infectado por *Acanthamoeba*, con daño severo en la córnea y pérdida de visión (Figura modificada de Siddiqui and Khan [2012]).

*Acanthamoeba* es capaz de adherirse a la superficie de la córnea previamente lesionada, e invadir el estroma (Khan, 2006); sin embargo, se ha demostrado que estas amebas pueden invadir y causar daños en el epitelio corneal sin necesidad de existir un daño previo en la córnea, para ello, los trofozoítos se adhieren a la córnea y migran al borde de las células desplazándose al espacio intracelular, tras la separación de las uniones intercelulares; una vez ahí, estas amebas forman protuberancias y provocan el desprendimiento celular, penetrando cada vez en capas más profundas del tejido corneal (Omaña-Molina et al., 2010).

La QA ha aumentado de forma global, asociada al aumento del uso de lentes de contacto, así como a la miopía, especialmente en niños; hay que destacar esta infección en individuos que han sufrido algún tipo de traumatismo corneal. La relación de esta infección con los usuarios de lentes de contacto se debe a varios factores. El uso prolongado de lentes de contacto deteriora la superficie ocular, lo que reduce las defensas del hospedador frente a este protozoo. La adquisición de esta infección ocurre en individuos que nadan o se bañan con las lentes de contacto, las limpian con agua del grifo o desinfectantes diluidos, o reutilizan la solución para las lentes de contacto (Kilvington et al., 2004; Jeong and Yu, 2005; Lorenzo-Morales et al., 2013a; Gomes Tdos et al., 2016; Kofman and Guarner, 2022; Wang et al., 2023). Además, hay que tener en cuenta que algunos de los brotes se han asociado a soluciones oftálmicas contaminadas que han sido retiradas del mercado (Verani et al., 2009).

Aunque la mayoría de los pacientes experimentan una infección unilateral, se ha descrito que puede ocurrir en ambos ojos al mismo tiempo, lo que sugiere una exposición a la misma fuente contaminada de forma continuada. Los factores de riesgo asociados a complicaciones inflamatorias y malos resultados incluyen el retraso en el diagnóstico y el tratamiento inicial con corticosteroides con la posible formación de queratoprecipitados, u otros tratamientos no amebicidas debido a un diagnóstico erróneo de otra etiología infecciosa, confundiendo de forma común con el virus del herpes simple (VHS). Otros factores de riesgo son el envejecimiento, la diabetes mellitus y la infección bacteriana (Wilhelmus et al., 2008; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Shimmura-Tomita et al., 2018; Kofman and Guarner, 2022).

En la mayoría de los casos clínicos descritos de QA predomina el genotipo T4 considerado el más virulento en todos los continentes, capaz de adherirse a las células epiteliales de la córnea del hospedador más firmemente. Otros genotipos asociados a la infección ocular son el T1, T2, T3, T5, T6, T10, T11, T12 y T15 (Niyayati et al., 2010; Lorenzo-Morales et al., 2011; Arnalich-Montiel et al., 2014; Diehl, Paes and Rott, 2021; Otero-Ruiz et al., 2022; Wang et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Se estima que la incidencia global anual de la QA es de 2,9 casos por millón de personas; pero varía de forma clara entre las diferentes regiones geográficas. Los datos epidemiológicos de Asia, África, Oceanía y Sudamérica son escasos, considerándose un infra-diagnóstico en el conjunto de la población. Sin embargo, donde existe la mayor incidencia descrita de esta infección es en la India, con 15,2 casos por millón de personas, seguido de Europa: en concreto, en Reino Unido la incidencia varía desde un 4,3 a 14,6 casos por millón de personas al año. Es importante insistir en mejorar la detección de este tipo de patología con el objetivo de conocer cuál es la extensión real de este problema (Ting et al., 2021; Azzopardi et al., 2023; Zhang et al., 2023).

#### 1.1.6.3.2. Diagnóstico de la QA

El diagnóstico de la QA es problemático y a menudo se diagnostica erróneamente como queratitis bacteriana, vírica o fúngica; los retrasos en el diagnóstico se asocian a la generación de síntomas más graves y peores resultados terapéuticos. Por lo que es importante una sospecha clínica precoz, valorándose la historia clínica del paciente, la posibilidad del traumatismo corneal, la exposición al agua o suelo contaminado, el uso de lentes de contacto o el tratamiento con corticosteroides. Un indicio claro de infección es el dolor agudo en aquellos pacientes que usan lentes de contacto; sin embargo, esta enfermedad también puede ser indolora, lo que genera incertidumbre diagnóstica. Los signos observados mediante examen oftalmológico pueden incluir infiltrados epiteliales, estromales y anulares, así como perineuritis (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Wynter- Allison et al., 2005; Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015; Zhang et al., 2023).

El raspado corneal es la técnica con mayor sensibilidad en el comienzo de la infección, ya que los trofozoítos están en la superficie del epitelio corneal; estos se examinan mediante frotis y pueden teñirse directamente con Giemsa, blanco de calcoflúor, lactofenol azul de algodón o naranja de acridina, tinciones que permitirán además observar los quistes; también pueden realizarse montajes húmedos con NaCl al 0,9% (Figura 11). Los cultivos de raspados de córnea o lentes de contacto pueden realizarse en agar no nutritivo con *Escherichia coli* o *Enterobacter* spp.; la observación de estos cultivos muestra las "huellas" que dejan los trofozoítos cuando se alimentan de estas bacterias, pudiendo llegar a observarse los trofozoítos y quistes si se han agotado los nutrientes (Martinez and Visvesvara, 1997; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Li et al., 2019; Kofman and Guarner, 2022).

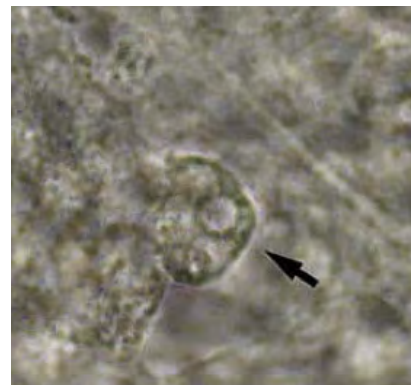


Figura 10. Trofozoito de *Acanthamoeba*. Examen directo con cloruro sódico (NaCl) al 0,9% (Figura tomada de Li et al. [2019]).

Otra técnica utilizada es la microscopía confocal *in vivo* (MCIV), una herramienta no invasiva para el diagnóstico clínico de la queratitis infecciosa grave, que posee una alta sensibilidad, observándose los quistes de *Acanthamoeba* spp. como estructuras esféricas hiperreflectantes (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Kofman and Guarner, 2022; Wang et al., 2023).

Sin embargo, la biopsia pasa a ser necesaria cuando los trofozoítos empiezan a causar lesiones más profundas e invadir el estroma. La histopatología de las biopsias corneales es otra estrategia frecuentemente utilizada en el diagnóstico de la QA. Esas muestras pueden teñirse con diferentes colorantes o pueden analizarse por técnicas de inmunofluorescencia. Algunas de las tinciones empleadas son hematoxilina-eosina, tinción con ácido de Schiff o la tinción de Gomori-Grocott, así como también las tinciones quimiofluorescentes con el blanco de calcoflúor y con la naranja de acridina (Marciano- Cabral and Cabral, 2003; Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015).

El cultivo y la microscopía tradicional se consideraban el patrón de oro para el diagnóstico de la QA, pero existen nuevas alternativas muy sensibles como la MCIV y las nuevas técnicas de PCR, tales como la PCR multiplex en tiempo real para la detección simultánea de las AVL o la PCR TaqMan® dúplex en tiempo real para la detección simultánea de 10 genotipos diferentes de *Acanthamoeba* (Qvarnstrom et al., 2006; Yera et al., 2007; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Goh et al., 2018; Zhang et al., 2023).

*“Otra técnica utilizada es la microscopía confocal in vivo (MCIV), una herramienta no invasiva para el diagnóstico clínico de la queratitis infecciosa grave, que posee una alta sensibilidad, ”*

Muchos factores pueden influir en la especificidad y sensibilidad de los métodos de diagnóstico, en concreto se conoce que la sensibilidad del método de cultivo puede alcanzar el 77%; siendo en el caso de los raspados corneales y la histopatología del 31% a 65%, mientras que la PCR tiene una sensibilidad del 84% al 100% (Kofman and Guarner, 2022).

*“Muchos factores pueden influir en la especificidad y sensibilidad de los métodos de diagnóstico, en concreto se conoce que la sensibilidad del método de cultivo puede alcanzar el 77%; ”*

Actualmente, ha aumentado el interés por el uso de modelos basados en la inteligencia artificial (IA) centrándose en el “aprendizaje profundo” (*deep learning*), con el objetivo de determinar patrones que puedan ser útiles para un rápido diagnóstico de la QA. Esto se realiza gracias a la capacidad de la IA de analizar datos de alta definición en poco tiempo, en este caso, a partir de imágenes confocales, aprovechando el examen corneal y la alta especificidad y sensibilidad de los métodos computacionales (Azzopardi et al., 2023; Zhang et al., 2023).

En definitiva, para garantizar un diagnóstico a tiempo, un tratamiento precoz de la QA, y por lo tanto, la mejoría en el pronóstico del paciente, debe realizarse una combinación de técnicas diagnósticas relacionando los hallazgos microbiológicos con los clínicos (Azzopardi et al., 2023).

### 1.1.6.3.3. Tratamiento de la QA

La QA es tratable pero difícil de erradicar. Actualmente no existe ningún fármaco 100% eficaz contra todos los genotipos de *Acanthamoeba* debido a la variación en su virulencia y a la falta de correlación entre la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* de los fármacos; por otro lado, los tratamientos actuales son prolongados y tienen efectos secundarios significativos, en gran parte debido a la necesidad de eliminar tanto los trofozoítos como los quistes resistentes. A pesar de esto, existen diversos agentes quimioterapéuticos disponibles para tratar la QA, incluyendo biguanidas, estatinas (pitavastatina entre otras), quinolonas, azoles (isavuconazol, voriconazol, etc.), diamidinas, antisépticos, antifúngicos como la anfotericina-B, fotodinámicos, antibióticos y antiparasitarios (miltefosina entre otros). Estas terapias se deben administrar por vía tópica y su frecuencia de dosificación se ajusta según las necesidades del paciente, pudiendo durar varios meses hasta la resolución satisfactoria de la queratitis (Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015; Hernández- Martínez et al., 2019; Hahn et al., 2020; Sifaoui et al., 2020b; Shing et al., 2020; Vázquez-Ortega et al., 2020; Shing et al., 2021; Sifaoui et al., 2022; Rodríguez-Expósito et al., 2022).

Cuando el tratamiento no es efectivo, se deben realizar intervenciones quirúrgicas que se centran en la extirpación del tejido corneal para eliminar la infección y sustituirlo por una nueva córnea de un donante; este trasplante de córnea conlleva cierto riesgo de reinfección, dependiendo del grado de erradicación de los patógenos antes de la cirugía. Otros tratamientos quirúrgicos, como la crioterapia, buscan tratar físicamente la infección congelando porciones de la córnea para erradicar directamente los parásitos. En casos en los que la cirugía y la quimioterapia no consiguen resolver la infección, se puede recurrir a la enucleación del ojo infectado (Martinez and Visvesvara, 1997; Marciano- Cabral and Cabral, 2003; Arnalich-Montiel et al., 2013a).

El tratamiento más utilizado contra la QA se basa en la utilización de dos agentes antimicrobianos tópicos dirigidos tanto a los trofozoítos como a los quistes; estos son la biguanida de polihexametileno (PHMB) al 0,02% y el digluconato de clorhexidina (CLHX) al 0,02%, utilizados en monoterapia o en combinación con otros fármacos (isetionato de propamida o hexamida). Así mismo, si hay bacterias asociadas a la infección, se recomienda el uso conjunto con antibióticos, como la neomicina o el cloranfenicol (Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik, 2015; Szentmáry et al., 2019; Kofman and Guarner, 2022).

#### Nuevas alternativas frente a la QA:

Como se ha comentado previamente, el tratamiento de la QA puede ser tóxico y doloroso. Los fracasos de los tratamientos actuales suelen atribuirse a la capacidad de las amebas para formar quistes resistentes; esta resistencia a los antimicrobianos unida a las infecciones recurrentes han impulsado la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos (Shing et al., 2021).

Un ensayo reciente en fase I en humanos ha mostrado una tolerancia general a concentraciones más altas de PHMB (0,08%), lo que hace posible tratar la invasión estromal profunda de la QA (Papa et al., 2022). También, se ha visto cómo la cloroquina es capaz de inhibir a las células durante la enquistación de manera dosis dependiente; esto genera una nueva diana potencial de la cloroquina en el proceso de enquistamiento, además de mostrar la importancia de la relación dosis-tiempo de los tratamientos frente a la QA (Jha et al., 2014; Wang et al., 2023).

“ Como se ha comentado previamente, el tratamiento de la QA puede ser tóxico y doloroso. ”

La eficacia anti-amebiana de las soluciones multiusos para lentes de contacto en ocasiones es insuficiente para reducir el riesgo de la infección por *Acanthamoeba*; a pesar de ello, algunos estudios han demostrado que, con bajas concentraciones de nanopartículas de plata como ingrediente en estas soluciones, se puede disminuir el riesgo de infección de QA (Hendiger et al., 2020; Hendiger et al., 2021). Además, se han llevado a cabo varios estudios sobre la efectividad de algunas soluciones oftálmicas frente a los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*, con resultados variables (Sifaoui et al., 2017; Magnet et al., 2018; Reyes-Batlle et al., 2019; Sifaoui et al., 2020a; Sifaoui et al., 2020b; Chiboub et al., 2021; Reyes-Batlle et al., 2021b; Randag et al., 2023).

Por otra parte, en un estudio reciente se ha realizado un cribado para conocer la actividad de un pequeño subconjunto de compuestos procedentes de la biblioteca del ReFRAME (Repurposing Focused Rescue and Accelerated MEdicinal chemistry) frente a las AVL, identificando nuevos candidatos para el desarrollo de fármacos contra *Acanthamoeba*, entre ellos la molécula de latrunculina-B, caracterizada por su actividad anti-infecciosa. Cabe destacar que se ha realizado un estudio en fase clínica I con este compuesto, para evaluar el efecto reductor de la presión intraocular (PIO) en pacientes con hipertensión ocular o con glaucoma primario de ángulo abierto temprano (Rasmussen et al., 2014; Kangussu-Marcolino et al., 2019; Shing et al., 2021).

“ algunos estudios han demostrado que, con bajas concentraciones de nanopartículas de plata como ingrediente en estas soluciones, se puede disminuir el riesgo de infección de QA. ”

La latrunculina-B es un macrólido procedente de la esponja de mar *Negombata magnifica*, anteriormente conocida como *Latrunculia magnifica*; esta esponja coloniza los arrecifes de coral del Mar Rojo, siendo capaz de vivir libre en su hábitat gracias a su mecanismo de depredación y defensa expulsando una toxina de color rojizo que puede envenenar a los peces. Gracias al estudio de esta toxina se llegó al descubrimiento de las latrunculinas, compuestos citotóxicos y antivirales con un potente y selectivo efecto sobre el citoesqueleto de la actina, desencadenando cambios morfológicos, la relajación celular, junto con un deterioro de la contractilidad celular, la alteración de la interacción célula-célula y el debilitamiento de los contactos entre las células y la matriz circundante. Este efecto es debido al anillo de 2-tiazolidinona capaz de unirse y secuestrar a la actina formando complejos, lo que provoca el desensamblaje de los filamentos de actina, sin alterar el microesqueleto y el sistema microtubular (Fürstner et al., 2005; Rasmussen et al., 2014).

La actina se encuentra principalmente en estructuras de locomoción citoplasmáticas, como son los acantapodios, y en diversas estructuras relacionadas con la endocitosis (González-Robles et al., 2008). La actina y las estructuras del citoesqueleto son imprescindibles para determinar la morfología y propiedades mecánicas de células eucariotas, además de estar relacionada en procesos de motilidad celular como la exocitosis o endocitosis, adhesión y patogenia de *Acanthamoeba* (Bretscher, 1991; Gumbiner, 1996; Pollard and Borisy, 2003; Dominguez and Holmes, 2011). Cabe destacar cómo la actina también media en la fagocitosis que se produce tras la adhesión de *Acanthamoeba* a las células corneales (Omaña-Molina et al., 2010). Teniendo en cuenta esto, la actina se considera una buena diana para la inhibición de *Acanthamoeba*, a la hora de prevenir la adhesión y realizar un daño en la morfología del citoesqueleto. Por ello, algunos fármacos, como las estatinas, se han probado como posibles tratamientos frente a la QA, ya que estas pueden disminuir las proteínas que regulan la organización del citoesqueleto de actina y actúan atacando al ergosterol de la membrana plasmática (Rodríguez-Expósito et al., 2022).

Las latrunculinas A y B son las dos latrunculinas más comunes que provocan una destrucción reversible, dependiente de la dosis y del tiempo, de los haces de actina y de las proteínas asociadas en diversas células cultivadas. En diversos estudios, se ha visto cómo para el tratamiento del glaucoma con latrunculina-B aumenta el flujo de salida y disminuye la PIO. La latrunculina-B en comparación con la latrunculina-A, es más potente en el aumento de la facilidad de flujo de salida y produce menos aumentos transitorios en la formación de humor acuoso, la permeabilidad endotelial corneal y la concentración de proteínas en la cámara anterior. Por ello se estima que la latrunculina-B podría ser un candidato mejor que la latrunculina-A en el tratamiento del glaucoma (Okka, Tian and Kaufman, 2004; McKee et al., 2011; Rasmussen et al., 2014).

El ensayo clínico en fase I con la latrunculina-B al 0,005/0,01%, administrado por vía tópica para el tratamiento de la hipertensión ocular bilateral o glaucoma primario de ángulo abierto en humanos, ha mostrado el aumento de la facilidad de flujo de salida y/o disminución de la PIO. En dicho estudio se observó que las dosis múltiples redujeron significativamente la PIO, aumentando la facilidad de flujo saliente, relajando el esfínter del iris y el músculo ciliar, sin efectos en la córnea y con escasos y leves efectos adversos oculares (Okka, Tian and Kaufman, 2004; Rasmussen et al., 2014; Thomasy et al., 2018).

“ En dicho estudio se observó que las dosis múltiples redujeron significativamente la PIO, aumentando la facilidad de flujo saliente, relajando el esfínter del iris y el músculo ciliar, sin efectos en la córnea y con escasos y leves efectos adversos oculares. ”

#### 1.1.6.4. Neumonía por *Acanthamoeba*

##### 1.1.6.4.1. Características de la neumonía por *Acanthamoeba*

La neumonía por *Acanthamoeba* se produce sobre todo en pacientes con una baja respuesta inmunitaria; esta infección puede diseminarse a otras partes del cuerpo. Aunque todavía no está claro el mecanismo de acción, se ha descrito en estudios realizados en ratones, que *Acanthamoeba* es capaz de provocar signos alérgicos de las vías respiratorias y que, además, la infección produce la inflamación de las vías respiratorias en los pulmones de los hospedadores. Los genotipos implicados en esta infección son el T2, T4, T5, T16 y T18 (Visvesvara et al., 1983; Kaul et al., 2008).

Hasta la fecha, se han descrito 19 casos sin supervivencia, la mayoría de los pacientes procedían de EE. UU., pero también se han descrito casos en Polonia, Austria, Francia, Corea, Japón e India (Kot, Łanocha-Arendarczyk and Kosik-Bogacka, 2021).

##### 1.1.6.4.2. Diagnóstico de la neumonía por *Acanthamoeba*

La infección se ha diagnosticado en la mayoría de los casos *post mortem* aislando amebas en el bronco-aspirado, en el lavado bronco alveolar, o en la biopsia del tejido pulmonar. Esta infección puede ser bilateral con infiltrados parcheados, y en algunos casos se ha determinado la disminución del nivel de hemoglobina, del hematocrito, de los glóbulos blancos y de las plaquetas (Im and Kim, 1998; Kot, Łanocha-Arendarczyk and Kosik-Bogacka, 2021).

Algunas características de los pacientes con neumonía por *Acanthamoeba* fueron la disminución del peso corporal y la deficiencia respiratoria; en el examen radiológico se observaron cambios intersticiales con edema pulmonar visible, además de múltiples lesiones nodulares en los pulmones del paciente infectado con *A. castellanii* (Kot, Łanocha-Arendarczyk and Kosik-Bogacka, 2021).

### 1.1.6.4.3. Tratamiento de la neumonía por *Acanthamoeba*

Múltiples factores complican el tratamiento y la prevención de las infecciones por *Acanthamoeba* como se ha indicado previamente. Estos incluyen la falta de fármacos autorizados actualmente contra la forma quística altamente resistente y por tanto inactivos, y las diferentes susceptibilidades de las cepas a los fármacos convencionales. Hoy en día no hay ningún fármaco aprobado para la neumonía causada por *Acanthamoeba*, y es tratada mediante antibióticos, antifúngicos o antiparasitarios (como la miltefosina) (Rayamajhee et al., 2022).

A continuación, se describe una tabla resumen de las infecciones producidas por *Acanthamoeba* en el hombre (Tabla 1).

Infección por <i>Acanthamoeba</i>	Ruta de entrada	Incubación	Síntomas clínicos	Patología	Diagnóstico	Tratamiento
<b>Queratitis por <i>Acanthamoeba</i> (QA)</b>	En usuarios de lentes de contacto Invasión corneal	Días Semanas	Fotofobia Dolor Enrojecimiento ocular Visión borrosa Oscurecimiento del epitelio Perineuritis Infiltrado estromal multifocal Escleritis y corioretinitis	Ulceración en la córnea	Microscopia confocal, raspado corneal, biopsia para cultivo, microscopía, PCR y genotipado	Tópico: PHMB 0,02-0,08% o CHLX 0,02-0,2% solos o en combinación con diamina: hexamidina 0,1% o propamidina 0,1%  Oral: voriconazol o miltefosina

**Tabla 1.** Infecciones por *Acanthamoeba* en el hombre. Resumen de las infecciones humanas asociadas a *Acanthamoeba* y principales características clínicas (Tabla modificada de Rayamajhee et al. [2022]).

Infección por <i>Acanthamoeba</i>	Ruta de entrada	Incubación	Síntomas clínicos	Patología	Diagnóstico	Tratamiento
<b>Infección cutánea o sinusitis</b>	Senos nasales Piel Tracto respiratorio	Semanas Meses	Sinusitis Lesión en piel y nódulos	Inflamación granulomatosa Reacción en la piel	Biopsia para cultivo, microscopía PCR y genotipado	Rifampicina + ketoconazol, ketoconazol/fluconazol+sulfadiazina, ketoconazol + 5-fluorocitosina, anfotericina B o gentamicina nasal itraconazol; clorhexidina tópica; itraconazol +2% ketoconazol crema; pentamidina; azitromicina
<b>Encefalitis granulomatosa amebiana (EGA)</b>	Senos nasales Piel Tracto respiratorio y epitelio olfativo	Semanas Meses	Dolor de cabeza y fiebre Rigidez de cuello Desorientación e irritabilidad	Necrosis focal Granulomas en cerebro Aumento de leucocitos	Biopsia de cerebro Análisis del suero (IFI) PCR	No son efectivos  Combinación de antibióticos, antifúngicos y miltefosina
<b>Neumonía</b>	Fosas nasales Tracto respiratorio	Semanas Meses	Bajo peso. Problemas para respirar Edema e infiltrados pulmonares Cambios en el hematocrito	Infiltrados con edema, nódulos	Aspirado y lavado bronquial Biopsia de tejido pulmonar	No están aprobados  Combinación de antibióticos, antifúngicos y miltefosina

**Continuación Tabla 1.** Resumen de las infecciones humanas asociadas a *Acanthamoeba* y principales características clínicas (Tabla modificada de Rayamajhee et al. [2022]).

### 1.1.7. Detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales

Tal y como se ha mencionado previamente, *Acanthamoeba* es un protozoo ubicuo, encontrado en diferentes estudios en muestras ambientales. *Acanthamoeba* spp. se ha detectado gracias a su capacidad de mantenerse y multiplicarse fácilmente en agar no-nutritivo suplementado con bacterias no encapsuladas ni pigmentadas, como *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes*. También es capaz de cultivarse sobre células de mamíferos (células Vero E6) y en una variedad de medios de cultivo líquido de forma axénica, siendo el más utilizado el medio PYG que permite la axenización de las cepas que han sido previamente aisladas en agar (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

Otras técnicas utilizadas para su detección son las tinciones, tales como la de azul de lactofenol, naranja de acridina, plata y blanco de calcoflúor, utilizadas para el diagnóstico en secciones histológicas y muestras ambientales, como por ejemplo el contenido de estuches de lentes de contacto (CDC, 2019).

Por otra parte, en los últimos años las técnicas moleculares han permitido determinar los genotipos y la variabilidad genética de *Acanthamoeba* en diferentes tipos de muestras, siendo muy útil en estudios ambientales, y de aplicación en aquellos en los que se evalúa la eficiencia del tratamiento del agua (Magnet et al., 2012; Magnet et al., 2014; Gomes et al., 2020). Las más utilizadas son: la PCR convencional de genotipo y la PCR triplex a tiempo real. La PCR convencional amplifica un fragmento del gen ASA.S1 de la subunidad 18S del ADN ribosomal con un tamaño entre 423 a 551 pb específico de *Acanthamoeba*, obtenido con los cebadores JDP1 y JDP2. Esta PCR es altamente específica para el género *Acanthamoeba*, siendo capaz de detectar todos los genotipos conocidos de forma individual gracias a la secuenciación (Schroeder et al., 2001). La PCR triplex a tiempo real es capaz de detectar de forma simultánea las especies de AVL: *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris*, y *N. fowleri*, esta PCR demostró una elevada especificidad siendo capaz de detectar una sola ameba por muestra analizada y un tiempo mínimo de realización de la prueba, inferior a 5 horas (Qvarnstrom et al., 2006).

La PCR como método de diagnóstico de *Acanthamoeba* posee una mayor sensibilidad (94%) en comparación con el examen microscópico (33%) o cultivo (77%); pero esta sensibilidad puede verse afectada en ocasiones por sustancias inhibidoras, un problema que influye particularmente en el análisis de muestras de origen ambiental (Magnet et al., 2012; Mungroo et al., 2022).

De hecho, en los estudios realizados por Gomes et al. (2020) consideran ambos métodos (PCR y cultivo) como complementarios en los estudios realizados en las ETAP y EDAR de la zona centro de España, detectando los genotipos T4 y T5 (Gomes et al., 2020).

“ La PCR triplex a tiempo real es capaz de detectar de forma simultánea las especies de AVL: *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris*, y *N. fowleri*, esta PCR demostró una elevada especificidad siendo capaz de detectar una sola ameba por muestra analizada y un tiempo mínimo de realización de la prueba, inferior a 5 horas. ”

En la Tabla 2 se muestran algunos estudios epidemiológicos más recientes sobre la presencia de estas amebas en muestras ambientales de agua como: las plantas de tratamiento de agua potable, agua corriente o el agua del grifo de diferentes países.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Agua de la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP)	Cultivo y microscopía	Alemania	(Hoffmann and Michel, 2001)
Agua de la ETAP	Cultivo, y PCR	Bulgaria	(Tsvetkova <i>et al.</i> , 2004)
Agua del grifo	Cultivo	Reino Unido	(Kilvington <i>et al.</i> , 2004)
Agua del grifo	Cultivo	Corea	(Jeong and Yu, 2005)
Agua corriente	Cultivo y PCR	Islas Canarias, España	(Lorenzo-Morales <i>et al.</i> , 2005c)
Agua corriente, aguas fluviales y marinas asociadas a actividades humanas	Cultivo y PCR	Jamaica	(Lorenzo-Morales <i>et al.</i> , 2005a)
Agua dulce	Cultivo y PCR	Egipto	(Lorenzo-Morales <i>et al.</i> , 2006)

Tabla 2. Ejemplos de detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales acuáticas en los últimos años.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Agua del grifo	PCR	Hong Kong	(Boost <i>et al.</i> , 2008)
Agua de la ETAP	Cultivo y PCR	Polonia	(Łanocha <i>et al.</i> , 2009)
Agua de la ETAP	Cultivo y PCR	Suiza	(Corsaro <i>et al.</i> , 2010)
Agua del aire acondicionado	PCR	Chile	(Astorga <i>et al.</i> , 2011)
Agua de la ETAP y de estaciones de aguas residuales y cuencas fluviales	Cultivo y PCR a tiempo real	Comunidad de Madrid, España	(Magnet <i>et al.</i> , 2012)
Agua de la ETAP	Cultivo y PCR	Aragón, España	(Garcia <i>et al.</i> , 2013)
Agua corriente	PCR a tiempo real y PCR 18S ARNr	Taiwán	(Kao <i>et al.</i> , 2013)
Duchas	Cultivo y PCR	Costa Rica	(Retana-Moreira <i>et al.</i> , 2014)
Agua doméstica y de uso recreacional	Cultivo y PCR	Jamaica	(Todd <i>et al.</i> , 2015)
Agua de la ETAP y sistemas de distribución	Cultivo y PCR	Malasia	(Richard <i>et al.</i> , 2016)
Aguas potable y fuentes de agua recreativa	Cultivo	Irán	(Niyyati <i>et al.</i> , 2016)

Continuación Tabla 2. Ejemplos de detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales acuáticas en los últimos años.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Agua de la ETAP	Cultivo, microscopía y PCR	Egipto	(Al-Herrawy and Gad, 2017)
Aguas potables municipales y fuentes de agua recreativa	PCR	Irán	(Javanmard <i>et al.</i> , 2017)
Agua de la ETAP	Cultivo y PCR	Comunidad de Madrid, España	(Gomes <i>et al.</i> , 2020)
Agua de la ETAP	PCR	China	(Li <i>et al.</i> , 2021)
<i>Biofilm</i> de cabezales de ducha, áreas de cocina y lavabos	Morfología y PCR	Irán	(Norouzi <i>et al.</i> , 2021)
Agua del grifo, de lagos, piscinas, aire acondicionado, mar y agua de riego	PCR 18S ARNr	Cabo Verde, África	(Sousa-Ramos <i>et al.</i> , 2022)
Agua potable rural	PCR convencional	China	(Zhou <i>et al.</i> , 2023)

Continuación Tabla 2. Ejemplos de detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales acuáticas en los últimos años.

Por otra parte, numerosos estudios en distintas muestras ambientales procedentes de los hospitales han mostrado una elevada presencia de *Acanthamoeba*, detectándose gracias al cultivo en agar no nutritivo y PCR de la subunidad 18S del ARNr y posterior secuenciación. Algunos de estos se muestran en la Tabla 3.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Agua potable de los hospitales	Cultivo	Irán	(Bagheri <i>et al.</i> , 2010)
Agua de las unidades de hemodiálisis y odontológicas	Cultivo y morfología (tinción tricrómico)	Alejandro, Egipto	(Hassan <i>et al.</i> , 2012).
Agua de los hospitales	Cultivo y PCR	India	(Khurana <i>et al.</i> , 2015)
Unidad de oftalmología	Morfología y PCR	Irán	(Lasjerdi <i>et al.</i> , 2015)
Unidades odontológicas	Morfología y PCR	Costa Rica	(Retana-Moreira <i>et al.</i> , 2015)
Polvo de los hospitales y agua estancada	Cultivo y PCR	Kashan, Irán	(Golestani <i>et al.</i> , 2018)
Agua y polvo de las unidades de hemodiálisis	Cultivo y PCR	Irán	(Saber <i>et al.</i> , 2019)
Agua del hospital	Cultivo y PCR	Nicaragua	(Retana Moreira <i>et al.</i> , 2020)
Polvo de los hospitales	Cultivo y PCR	Irán	(Mahmoudi <i>et al.</i> , 2021; Abedi <i>et al.</i> , 2021; Khedri <i>et al.</i> , 2023)
Muestras ambientales de los hospitales	Microscopía y PCR	Irán	(Mohammady <i>et al.</i> , 2023)

Tabla 3. Ejemplos de detección de *Acanthamoeba* en muestras ambientales de hospitales en los últimos años.

### 1.1.8. Prevención y control de *Acanthamoeba*

La prevención y el control de estas amebas es difícil, al tratarse de organismos ubicuos. De hecho, en el caso de la EGA, no hay medidas profilácticas específicas que puedan emplearse para evitar esta infección, al afectar sobre todo a individuos inmunocomprometidos esta prevención es más complicada (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007).

Aunque inicialmente la infección por *Acanthamoeba* spp. se asociaba a pacientes inmunocomprometidos, desde 1986 se ha convertido en un problema de salud pública mundial al causar infecciones en usuarios sanos de lentes de contacto, como es el caso de la QA. Estos usuarios son aquellos que fundamentalmente deben seguir algunas estrategias determinadas para la prevención de esta infección; siendo la estrategia general impedir el contacto directo de *Acanthamoeba* con el ojo. Para ello, se debe evitar el uso de lentes de contacto al realizar actividades que impliquen agua, incluida la ducha o el baño; otras estrategias a seguir son: lavar las manos con agua y jabón y secarlas bien antes de manipular las lentes de contacto, cambiar las lentes según lo prescrito, usar lentes reutilizables, limpiarlas con los líquidos correspondientes según las instrucciones del fabricante, no usar otro tipo de agua o solución salina casera para desinfectar, guardar bien las lentes de contacto con líquido renovado en cada uso utilizando recipientes de almacenamiento limpios y adecuados que deben ser reemplazados cada 3 meses, y, por último, someterse a revisiones oculares periódicas, acudiendo al médico en cuanto haya algún síntoma o signo de infección en el ojo (CDC, 2019; Kofman and Guarner, 2022). De hecho, en un estudio realizado por Gomes et al. se detectó una alta presencia del ADN de *Acanthamoeba* (49,2%) en lentes de contacto donadas por individuos sanos que reconocieron no mantener las prácticas higiénicas adecuadas con estas (Gomes Tdos et al., 2016).

Estas amebas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y con frecuencia están asociadas al biofilm en el medio ambiente, estos biofilm proporcionan al parásito protección frente a agresiones externas, favoreciendo así su mayor patogenicidad, además de proteger y facilitar la diseminación de otros patógenos que residen en las amebas. Por ello, algunos estudios, han propuesto como medida preventiva controlar y limitar la formación de estos biofilm en superficies de filtros, tuberías o reservorios en el sistema de purificación y distribución del agua (Wingender and Fleming, 2011; Pinto et al., 2021).

“ algunos estudios, han propuesto como medida preventiva controlar y limitar la formación de estos biofilm en superficies de filtros, tuberías o reservorios en el sistema de purificación y distribución del agua. ”

Por otro lado, diferentes autores consideran que la mayor estrategia de prevención y control frente a *Acanthamoeba* es disminuir la posibilidad de exposición del hombre en aguas destinadas al consumo humano, pero esta medida es muy difícil de realizar ya que tanto en la normativa europea como en la española no se recoge el control de estos parásitos (Magnet et al., 2012; Cope, Roy and Ali, 2018; Shimmura-Tomita et al., 2018; Directive-(EU)-2020/2184, 16 December 2020; Gomes et al., 2020; Kofman and Guarner, 2022; Mungroo et al., 2022). La normativa española utilizada para el tratamiento de agua potable es el Real Decreto-Ley 3/2023, en el cual no se hace mención a un control específico de *Acanthamoeba* u otras AVL (Real Decreto-Ley 3/2023).

### 1.1.9. Papel vectorial de *Acanthamoeba*

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* se alimentan preferiblemente de bacterias Gram-negativas que se encuentran en el ambiente, a través de fagocitosis y de la posterior lisis bacteriana en el interior de un fagolisosoma. Debido a esta capacidad fagocítica se considera que *Acanthamoeba* es capaz de albergar en su interior numerosos microorganismos como bacterias, virus, hongos y protozoos, siendo algunos de estos, patógenos para el ser humano (Tabla 4). Esta capacidad de endocitosis puede hacer que *Acanthamoeba* actúe como reservorio ambiental de estos microorganismos y favorezca el desarrollo de los mismos en su interior, considerándose por lo tanto microorganismos obligados o facultativos. Además, se ha descrito que muchas de estas bacterias pueden adquirir factores de virulencia en el interior de las amebas, lo que posiblemente favorezca su supervivencia en otras células fagocíticas, como por ejemplo, *Legionella* en los macrófagos humanos; esto unido a la capacidad de resistencia de los quistes a procesos de desinfección (tratamiento con cloro e irradiación de luz UV, entre otros) hace que algunas de las bacterias sean capaces de sobrevivir y multiplicarse en el interior de estos quistes, estando protegidas y escapando de los tratamientos de desinfección. Este es uno de los motivos por el cual estas amebas tienen una gran importancia epidemiológica y una gran implicación en la salud humana, teniendo un papel primordial en la etiología de ciertas enfermedades bacterianas en la comunidad y en un entorno nosocomial, debido a capacidad de colonizar distintos sistemas de distribución de agua (torres de refrigeración, humidificadores, redes de distribución de agua potable u hospitales) (Visvesvara, Moura and Schuster, 2007; Corsaro et al., 2010; Siddiqui and Ahmed Khan, 2012; Kofman and Guarner, 2022).

Drozanski demostró por primera vez la infección de *Acanthamoeba* spp. por bacterias y su posterior salida como resultado de esta interacción (Drozanski, 1956). Algunos años más tarde, se observó que muchas de esas amebas llevaban también otros simbioses en su interior, pudiendo actuar como reservorios e incluso como “Caballo de Troya” de distintas bacterias, de forma que estarían protegidas del estrés medioambiental y podrían diseminarse y multiplicarse a través de estas amebas. La interacción de estas amebas con bacterias constituye una relación altamente compleja que puede estar influida por distintos factores: la virulencia de la ameba, la virulencia de la bacteria y las condiciones ambientales a las que están expuestas (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

“ La interacción de estas amebas con bacterias constituye una relación altamente compleja que puede estar influida por distintos factores: la virulencia de la ameba, la virulencia de la bacteria y las condiciones ambientales a las que están expuestas. ”

Esta relación de simbiosis es altamente compleja, viéndose reflejada en ocasiones con un beneficio tanto para la ameba como para el microorganismo. Algunas de estas bacterias, como *Legionella*, han desarrollado resistencia a la fagocitosis, pudiendo no solo sobrevivir en el interior de la ameba sino también multiplicarse. Este tipo de interacción permitió la utilización de cultivos de *Acanthamoeba* para el aislamiento de algunos microorganismos difíciles de cultivar, como por ejemplo *Legionella* (Rowbotham, 1983; Marciano-Cabral and Cabral, 2003; José Maschio, Corção and Rott, 2015).

Bacterias	Virus	Hongos	Protozoos
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Adenovirus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptosporidium</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coxsackievirus</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Bartonella</i> spp.	<i>Echovirus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<i>Burkholderia</i> spp. y <i>B. pickettii</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Exophiala dermatitidis</i>	
<i>Caedibacter caryophilus</i>	<i>Poliovirus</i>	<i>Fusarium solani</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Sporothrix</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Chlamydomonas pneumoniae</i>	<u>Virus gigantes:</u> <i>Faustovirus</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>	
<i>Cochliophilus cryoturris</i>	<i>Lausannevirus</i>	<i>Streptomyces californicus</i>	
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Marseillevirus</i>		
<i>Cytophaga</i> spp.	<i>Mollivirus</i>		
<i>Escherichia coli</i> O157 y <i>E. coli</i> K1	<i>Moumouvirus</i>		
<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Pandoravirus</i>		
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Pithovirus</i>		
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Senegalvirus</i>		
<i>Holospira elegans</i> y <i>H. obtuse</i>	<i>Tunisvirus</i>		
<i>Legionella</i> spp.	Virófago <i>Sputnik</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	Virófago <i>Zamilon</i>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> y <i>M. leprae</i>	<i>Mimivirus</i>		
<i>Neochlamydia</i> spp.			

Tabla 4. Ejemplos de organismos que pueden actuar como endosimbiontes de *Acanthamoeba* spp. (Tabla modificada de Siddiqui y Ahmed Khan [2012]).

Bacterias	Virus	Hongos	Protozoos
<i>Paenibacillus</i> spp.			
<i>Parachlamydia Acanthamoebae</i>			
<i>Pasteurella multocida</i>			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			
<i>Prevotella intermedia</i>			
<i>Protochlamydia amoebophila</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Rickettsia</i>			
<i>Salmonella typhimurium</i>			
<i>Shigella dysenteriae</i> y <i>S. sonnei</i>			
<i>Simkania negevensis</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Vibrio cholerae</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>			
<i>Waddlia chondrophila</i>			

Continuación Tabla 4. Ejemplos de organismos que pueden actuar como endosimbiontes de *Acanthamoeba* spp. (Tabla modificada de Siddiqui y Ahmed Khan [2012]).

#### 1.1.9.1. Interacción *Acanthamoeba*-*Legionella*

En 1980, Rowbotham describió por primera vez la interacción entre *Acanthamoeba* y *Legionella*, una bacteria intracelular capaz de sobrevivir en ambientes desfavorables gracias a su simbiosis con esta ameba (Rowbotham, 1980). Se ha descrito que aproximadamente el 20-24% de los aislados corneales y ambientales de *Acanthamoeba* albergan bacterias intracelulares (Fritsche et al., 1993; Fritsche et al., 2000).

Las bacterias, entre ellas *Legionella*, pueden encontrarse tanto en el trofozoíto como en el quiste de la ameba, confiriéndole protección frente a los factores adversos ambientales, como son el estrés osmótico, la falta de nutrientes, el calor y los biocidas; y, como consecuencia, ayudando así a la supervivencia de la bacteria en el ambiente y frente a los tratamientos de desinfección del agua (Barker, Scaife and Brown, 1995; Magnet et al., 2015). *Legionella* es capaz de vivir y multiplicarse en el interior de *Acanthamoeba*, y en algunas ocasiones se ha descrito el aumento de su virulencia al utilizar la infección en estas amebas como "campo de entrenamiento" para la posterior infección en los macrófagos humanos (Richards et al., 2013), adquiriendo proteínas de los eucariotas mediante transferencia horizontal de genes (Bruggemann et al., 2006; Escoll et al., 2013).

La entrada de *Legionella*, tanto en *Acanthamoeba* como en los macrófagos alveolares, se produce por un mecanismo de "fagocitosis por enrollamiento" (*coiling phagocytosis*) por la que surge un pseudópodo que va enrollando a la bacteria en una espiral que da lugar a un fagosoma que inhibe la fusión del mismo con los lisosomas (Bozue and Johnson, 1996). *L. pneumophila* elude dentro de *Acanthamoeba* las defensas del hospedador, y, a su vez, accede a los nutrientes a través del retículo endoplasmático, transportadores de membrana y la fusión con otras vesículas citoplasmáticas. Se ha demostrado que *L. pneumophila* escapa al fagosoma de *A. castellanii* produciendo subpoblaciones capaces de persistir, altamente virulentas y tolerantes a los antibióticos, debido a que han sufrido distintas alteraciones morfológicas y transcripcionales durante el curso de la infección (Figura 12). De forma similar, *L. feeleii* expresa, tras infectar *Acanthamoeba*, los factores SdhA y LegK2 implicados en la fusión fagosoma-lisosoma y en el redireccionamiento del fagosoma a un compartimento replicativo (Gomes et al., 2018).

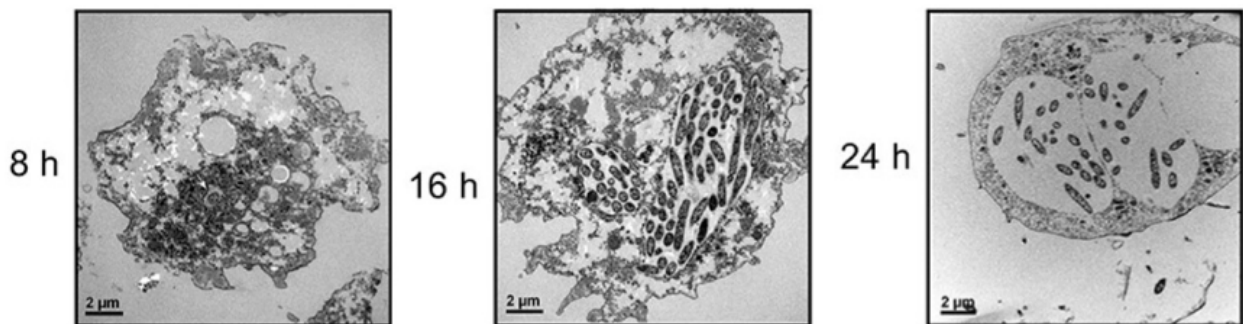


Figura 12. Imágenes de *Acanthamoeba castellanii* infectada con *Legionella pneumophila*. Imágenes tomadas en microscopía electrónica de *Acanthamoeba castellanii* post infección con *L. pneumophila* a las 8, 16 y 24 horas (Figura tomada de Li et al. [2020]).

Una vez que *Acanthamoeba* fagocita a *Legionella* y esta última escapa de la actividad de los lisosomas para multiplicarse en el citoplasma, se produce la lisis del protozoo, liberándose así al medio (Figura 13). Este mecanismo de interacción se altera por la temperatura, de modo que, a temperaturas de alrededor de los 37°C, *Legionella* es capaz de evadir la digestión amebiana y reproducirse, mientras que a 20°C, es *Acanthamoeba* la que utiliza las bacterias como nutriente (Anand et al., 1983). La capacidad de *Legionella* para resistir la depredación por *Acanthamoeba* en el medio ambiente puede impulsar la evolución de rasgos que posteriormente pueden ser utilizados como rasgos de virulencia durante las infecciones humanas, resistiendo a los fagocitos del SI (Rayamajhee et al., 2022).

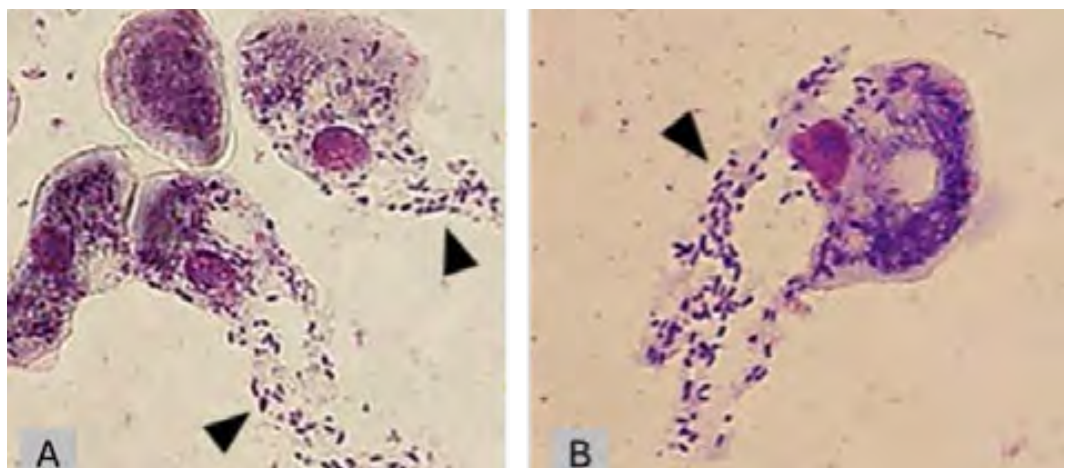


Figura 13. Imágenes de la liberación de *Legionella* tras su paso por *Acanthamoeba*. Tinción de Giemsa de lisis celular de *Acanthamoeba castellanii* con *Legionella* en su interior (Figura tomada de Kim et al. [2023]).

Cuando la internalización ocurre en los macrófagos, tras su multiplicación, *Legionella* induce la apoptosis de estos, pero no así en *Acanthamoeba* en la que induce necrosis. La salida de las bacterias de las amebas necrotizadas se realiza mediante la formación de poros (Gao and Kwaik, 2000). Debido a que los mecanismos de reconocimiento, entrada y división intracelular de *Legionella* en células de mamíferos como en amebas son muy similares, la interacción previa con *Acanthamoeba* parece conferir a *Legionella* una serie de atributos que le facilitan su supervivencia en el hospedador humano y la capacidad de producir la apoptosis en los macrófagos. Se han observado cambios en la morfología y fisiología de *Legionella* tras su paso por *Acanthamoeba*, como, por ejemplo, la reducción en el tamaño bacteriano cuando se compara con las bacterias que han crecido en cultivos *in vitro*, cambios en la superficie bacteriana o incluso en la motilidad. Por otra parte, como ya se ha comentado, las bacterias que han crecido dentro de las amebas son más resistentes a los agentes biocidas y presentan una mayor capacidad para dividirse e invadir los macrófagos humanos (Cirillo, Falkow and Tompkins, 1994; Barker, Scaife and Brown, 1995).

Además de la interacción de *Acanthamoeba* con diferentes especies de *Legionella* cultivables, se han descrito un grupo de 12 bacterias conocidas como LLAP (“*Legionella*-like Ameba Pathogens”, patógenos de amebas similares a *Legionella*) que pueden producir infecciones respiratorias en el hombre, pero que no son cultivables *in vitro* (Drozanski, 1956). Las AVL son su principal hospedador ambiental, donde estas bacterias no solo sobreviven, sino que también logran multiplicarse; esta relación puede conducir a un aumento de la virulencia bacteriana (Magnet et al., 2015).

---

## 1.2. LEGIONELLA

*Legionella* es una bacteria Gram-negativa presente en diversos ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales, llegando a estar presente en las redes de abastecimiento de agua potable y por lo tanto en las edificaciones que se abastecen de esta agua, como es el caso de los hospitales. Esta bacteria es capaz de producir infección pulmonar y extrapulmonar debido a la inhalación de aerosoles de agua contaminada generados por pulverizaciones, chorros o nebulizaciones (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022; OMS, 2022).

*Legionella* se encuentra en el ecosistema acuático, ya sea libremente, asociada al biofilm, y/o en el interior de diversos protozoos, entre ellos *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vermamoeba* (*Hartmannella*) y *Tetrahymena*. Debido a la capacidad de simbiosis con las AVL, se consideran bacterias intracelulares, capaces de sobrevivir y multiplicarse, no solo en el interior de estas amebas, sino también, dentro de los macrófagos alveolares llegando a producir la patología humana (Mercante and Winchell, 2015; Gomes et al., 2020).

“*Legionella* es una bacteria Gram-negativa presente en diversos ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales,”

*Legionella pneumophila* es la especie más importante conocida como agente causal de la enfermedad del legionario, o legionelosis, y de la fiebre de Pontiac. Sin embargo, hasta el momento, más de 60 especies se han aislado del medio ambiente, y aproximadamente la mitad de estas son capaces de producir enfermedad en los seres humanos, como es el caso de *L. feeleii*, *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. bozemanii* o *L. jordanis*, entre otras (Greub and Raoult, 2004).

Desde el punto de vista bioquímico, estas bacterias se consideran catalasa positiva, oxidasa variable, ureasa negativa, licuan la gelatina, y no poseen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos, ni de fermentar los hidratos de carbono. Estas bacterias se consideran microorganismos aerobios obligados, característicos por sus exigentes requerimientos nutricionales, la principal fuente de energía y carbono de estas bacterias son los aminoácidos de serina, treonina, histidina, tirosina y triptófano, además de otros compuestos orgánicos como el almidón. La mayoría de las especies de *Legionella* poseen actividad férrico reductasa, generando un pigmento marrón llamado piomelanina, y producen  $\beta$ -lactamasas, por lo que son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Pine et al., 1979; Benson and Fields, 1998; Chatfield and Cianciotto, 2007).

Estas bacterias son termotolerantes, siendo capaces de multiplicarse entre los 20°C y los 45°C; de permanecer latentes entre 45°C y 60°C y de llegar a inactivarse a temperaturas superiores a los 70°C (Ausina et al., 2005; Murray, 2021).

*Legionella* es capaz de crecer en medios selectivos y no selectivos, detectándose colonias tras 3 a 5 días de incubación con un diámetro entre 0,5 mm a 1 mm, que se encuentran aisladas individualmente, con forma plana, márgenes definidos y apariencia iridiscente (Figura 14). Las colonias más antiguas miden entre 3 y 4 mm con una forma más convexa y su aspecto se asemeja a un cristal escarchado. Para su confirmación deben realizarse cultivos en diferentes medios selectivos en presencia y ausencia de L-cisteína, ya que estas bacterias son dependientes de este aminoácido, el más utilizado es el medio BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract agar*) con y sin cisteína. A la hora de detectar las diferentes especies de *Legionella*, se emplean técnicas más sofisticadas como son los métodos de aglutinación, análisis de las características fenotípicas, identificación serológica o técnicas moleculares, entre otras (Cunha, Burillo and Bouza, 2016).



Figura 13. Colonias de *Legionella* spp. tras 5 días de incubación a 37°C en placa de Agar BCYE con L-cisteína (Figura tomada del catálogo de la web de Thermo Fisher Scientific Inc.).

Por otra parte, conviene realizar una tinción de Gram ya que estas bacterias son Gram-negativas con capacidad pleomórfica, poseen un tamaño entre 0,3-0,9  $\mu$ m por 2  $\mu$ m. Dependiendo de la temperatura y las condiciones del medio en el que se encuentran (pH, presencia de nutrientes y metabolitos) pueden encontrarse en forma de cocobacilos cortos, bacilos finos y/o formando largos filamentos (Figura 15) (Mercante and Winchell, 2015; Murray, 2021). Además, algunas de las especies pueden presentar un flagelo polar o lateral implicado en la motilidad (Benson and Fields, 1998).

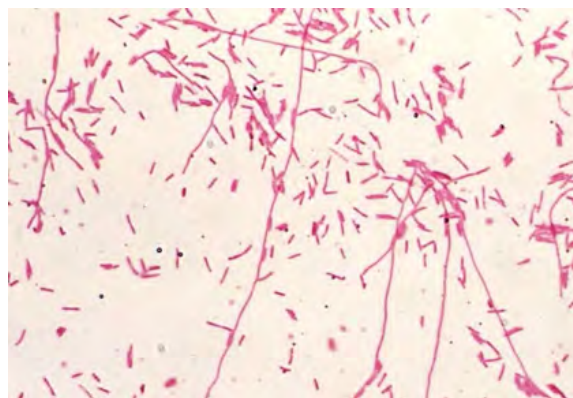


Figura 15. Tinción de Gram de *Legionella* spp.: Bacilos finos y formando filamentos de *Legionella* spp. en microscopía óptica con tinción de Gram (Figura tomada de la web del CDC- PHIL Public Health Image Library).

### 1.2.1. Historia de Legionella

En 1979 se estableció por primera vez el género *Legionella*, tres años después de la 76ª Convención de la Legión Americana, realizada en la ciudad de Filadelfia en 1976, en donde se desarrolló un gran brote de neumonía que afectó a los participantes, causando el ingreso de 147 individuos y el fallecimiento de 29 de ellos. Este brote llevó a una intensa investigación del agente causal, identificando así a un bacilo Gram-negativo, que fue caracterizado y clasificado como *Legionella pneumophila* en referencia a los legionarios que fueron víctimas en este brote (Sharrar and Parkin, 1976; Fraser et al., 1977; Brenner, Steigerwalt and McDade, 1979).

El descubrimiento de *Legionella* y el desarrollo de medios de crecimiento bacteriano apropiados para esta bacteria permitieron el estudio retrospectivo de antiguos brotes en pacientes con síntomas respiratorios no resueltos, describiéndose más de 50 especies nuevas de *Legionella*, de las cuales 24 se asociaron a enfermedades en humanos (Newton et al., 2010). En 1943, Tatlock aisló las primeras cepas de *Legionella* spp.; este descubrimiento se realizó en cobayas a través del uso de técnicas para el aislamiento de *Rickettsia*. En 1947, Jackson et al. describieron una nueva cepa, y fue en 1954, cuando Drozanski, en Polonia, consiguió aislar una bacteria capaz de infectar a las AVL del suelo (Tatlock, 1944; Drozanski, 1956). Estos microorganismos fueron descritos inicialmente pertenecientes al género *Rickettsia*, sin embargo, muchas de estas especies se reclasificaron posteriormente como *Legionella* (Hookey et al., 1996).

“ En 1979 se estableció por primera vez el género *Legionella*, tres años después de la 76ª Convención de la Legión Americana, realizada en la ciudad de Filadelfia en 1976, en donde se desarrolló un gran brote de neumonía que afectó a los participantes, causando el ingreso de 147 individuos y el fallecimiento de 29 de ellos. ”

### 1.2.2. Taxonomía y clasificación de Legionella

La clasificación taxonómica de los organismos procariotas, a diferencia de los eucariotas, se realiza según la opinión y el juicio científico, por lo que varía a lo largo de los años. Actualmente, el mejor consenso en la comunidad científica es la “Guía Taxonómica de Bacterias y Arqueas” (*Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*) elaborada en el *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2015). Basándose en esto la clasificación taxonómica de *Legionella* spp. se muestra en la Tabla 5.

TAXONOMÍA	
DOMINIO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Pseudomonadota</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Legionellales</i>
FAMILIA	<i>Legionellaceae</i>
GÉNERO	<i>Legionella</i>
ESPECIES	<i>L. pneumophila</i> ; <i>L. feeleii</i> ; <i>L. tunisiensis</i> ; <i>L. micdadei</i> <i>L. jordanis</i> ; <i>L. donaldsonii</i> ; <i>L. anisa</i> ; <i>L. dumoffii</i> ; <i>L. longbeache</i> ; <i>L. gormanii</i> ; etc.
SUBESPECIES	<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i> <i>Legionella pneumophila subsp. pascullei</i> <i>Legionella pneumophila subsp. fraseri</i>

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Legionella*.

El género *Legionella* pertenece a la familia Legionellaceae, si bien, algunos investigadores propusieron dentro de esta familia tres géneros separados: *Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia* (Garrity, Brown and Vickers, 1980). Sin embargo, el análisis del ARNr 16S confirma que estas bacterias poseen una similitud de más del 95% entre ellas, lo que no justificaba tal división, siendo la familia Legionellaceae un único subgrupo monofilético dentro de la subdivisión Gammaproteobacteria (Fry et al., 1991).

El género *Legionella* comprende más de 60 especies aisladas de muestras ambientales y alrededor de la mitad de estas especies se asocian a alguna enfermedad; estas han sido clasificadas en base a las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas (Khodr et al., 2016). La primera especie descrita fue clasificada como *Legionella pneumophila Philadelphia-1*, esta denominación se debe a la palabra "legión" como referencia del aislamiento a partir de los legionarios americanos; pneumōn/philos, que provienen del griego antiguo "pulmón" y "amor fraterno"; y la cepa Philadelphia, en honor a la ciudad donde fue aislada (Brenner, Steigerwalt and McDade, 1979). Esta especie está dividida en 16 serogrupos de acuerdo con su distribución antigénica detectada por anticuerpos monoclonales; las cepas del serogrupo-1 se dividen a su vez en sub-grupos (Joly et al., 1986; Helbig et al., 1997).

En 1988, Brenner dividió la especie *L. pneumophila* en tres sub-especies: *L. pneumophila pneumophila*, *L. pneumophila fraseri* y *L. pneumophila pascullei* (Brenner et al., 1988). Hoy en día, *L. pneumophila* comprende 16 serogrupos, de los cuales el serogrupo-1 es el más frecuente (Murray, 2021). Por otro lado, se han identificado doce grupos filogenéticos de bacterias pertenecientes a cinco especies que se han descrito como LLAP, cuya característica es la capacidad de vivir en el interior de las AVL; este grupo de bacterias está relacionado estrechamente con el género *Legionella*, teniendo en cuenta la secuencia del gen del ARNr 16S; debido a esto, actualmente, se han asignado como especies de *Legionella*: *L. drozanskii* (LLAP-1), *L. lytica* (LLAP-3, LLAP-9, LLAP-7), *L. rowbothamii* (LLAP-6), *L. fallonii* (LLAP-10), y *L. drancourtii* (LLAP-12). La gran diferencia entre estas LLAP y *Legionella* es que las LLAP no pueden ser cultivadas en los medios de cultivo típicos para *Legionella* (Fields, Benson and Besser, 2002; Muder and Yu, 2002; Khodr et al., 2016).

“ Por otro lado, se han identificado doce grupos filogenéticos de bacterias pertenecientes a cinco especies que se han descrito como LLAP, cuya característica es la capacidad de vivir en el interior de las AVL; ”

Aun cuando *L. pneumophila* es la especie más estudiada debido a su prevalencia y capacidad de producir enfermedad en humanos, *L. feeleii* se considera la segunda especie más patógena. Esta especie fue aislada en 1981 en el sistema de refrigeración de una planta ensambladora de coches en Canadá, afectando a 317 empleados, los cuales fueron diagnosticados mediante ensayos serológicos y evaluación clínica. Pero no fue hasta 1984, cuando se describió *L. feeleii* como una nueva especie, cuyo nombre hace honor al investigador que participó en el estudio de las epidemias por *Legionella*, el Dr. James C. Feeley (Herwaldt et al., 1984). Al año siguiente, se aisló e identificó el serogrupo-2 de *L. feeleii* procedente de un paciente con neumonía (Thacker et al., 1985).

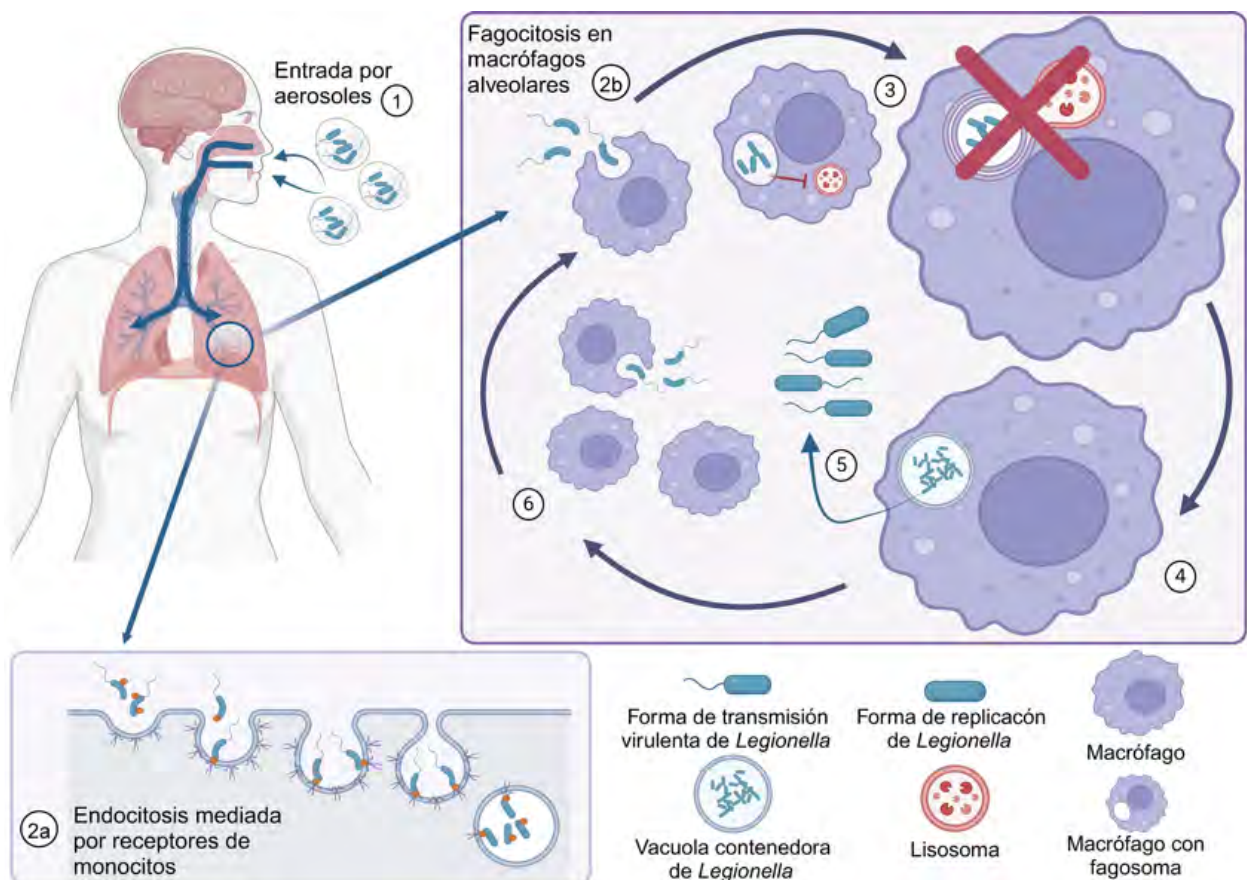
### 1.2.3. Ciclo biológico de *Legionella*

*Legionella* es una bacteria intracelular facultativa que puede vivir y multiplicarse de manera similar en el interior de las AVL, las células epiteliales, los monocitos humanos y los macrófagos alveolares de los hospedadores infectados. La infección en el hombre se debe a la inhalación de partículas de aerosoles o agua contaminadas con *Legionella*; de esta manera accede al pulmón infectando los macrófagos alveolares y llegando a producir el desarrollo de una neumonía atípica (Murray, 2021).

“ *Legionella* es una bacteria intracelular facultativa que puede vivir y multiplicarse de manera similar en el interior de las AVL, ”

*L. pneumophila* en su ciclo de vida alterna entre la forma de transmisión virulenta (flagelar) y la forma de replicación (inmóvil) situada en el interior de los macrófagos alveolares y en las AVL (Rowbotham, 1986). En primer lugar, la bacteria entra en la célula por fagocitosis convencional o por enrollamiento, excepto en los monocitos humanos y en algunas AVL donde se produce a través de una macro-pinocitosis o endocitosis mediada por receptores de fagocitosis. A continuación, las cepas virulentas son capaces de sobrevivir e iniciar una cascada de señalización para evitar la fagocitosis y transformar el fagosoma en un nicho para la multiplicación, evitando la fusión con el lisosoma. *Legionella* capta vesículas derivadas del retículo endoplasmático de la célula hospedadora para convertir el fagosoma en una vacuola contenedora de *Legionella* (VCL) y de replicación, donde se multiplican por fisión binaria. Para ello, la bacteria inhibe el estallido oxidativo, reduce la acidificación del fagosoma, bloquea la fusión fagosoma- lisosoma con la ayuda de la enzima serina-treonina quinasa, cambia el "tráfico" de orgánulos y modula la maduración endosomal en la célula hospedadora (Fields, Benson and Besser, 2002; Allombert et al., 2013).

Al disminuir los nutrientes, se activa la expresión de genes que inducen la apoptosis y necrosis de la célula para liberar las bacterias. Además, se activa la expresión de genes de infectividad que ayudan a *L. pneumophila* a resistir al estrés extracelular y mejoran la invasión de otras células (Kirby et al., 1998; Alli et al., 2000; Hammer, Tateda and Swanson, 2002). Así evoluciona a la forma infectiva flagelar que puede diseminar e inhibir la maduración del fagosoma en la nueva célula hospedadora, pudiendo volver a realizar su ciclo de vida (Figura 16) (Byrne and Swanson, 1998; Fields, Benson and Besser, 2002).



**Figura 16.** Ciclo de vida de *Legionella*. (1) *Legionella* entra a las vías aéreas, (2a) La bacteria entra por endocitosis a los monocitos y/o (2b) es fagocitada por macrófagos alveolares, (3) evita la fusión lisosoma-fagosoma, (4) las cepas virulentas se dividen en la vacuola contenedora de *Legionella* (5) induce la muerte de la célula y son liberadas, (6) infectan a otras células. Creado con BioRender.com.

#### 1.2.4. Distribución y epidemiología de *Legionella*

*Legionella* se encuentra de forma ubicua en ambientes acuáticos tanto naturales como artificiales, entre ellos, lagos, ríos, aguas termales, sistemas de distribución de agua, torres de aire acondicionado, humidificadores, instalaciones de hidromasaje, etc. Por otra parte, cabe destacar que algunas especies, entre ellas *L. longbeachae*, se pueden hallar en el suelo (OMS, 2022). Aquellos individuos que estén expuestos a estos nichos son susceptibles de ser infectados, según la frecuencia, duración y distancia a la que se encuentren del agua contaminada. Sin embargo, la probabilidad de que una de estas fuentes cause infección depende de la concentración bacteriana, la virulencia de la bacteria, la eficacia de la transmisión y el tipo de aerosol (Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

Estos ecosistemas actúan como reservorios para la infección de estas bacterias, que son capaces de vivir y crecer en el agua a temperaturas entre 20°C y 50°C, pudiendo proliferar en AVL o en los biofilm creados debido al estancamiento del agua y la acumulación de sedimentos que sirven de nutrientes para estas bacterias, llegando a aislarse más de una especie en el mismo lugar (Ausina et al., 2005). Cabe destacar que tanto las AVL, actuando como hospedador, así como el biofilm, favorecen la distribución y protección ante elevadas temperaturas, desinfectantes y altas concentraciones de cloro (Thomas et al., 2006; Thomas et al., 2008; Mercante and Winchell, 2015). Por otra parte, en el biofilm pueden realizarse transferencia horizontal de genes que confieren resistencia a *Legionella* frente a los biocidas. Teniendo en cuenta esto, la presencia del biofilm y de las AVL, junto con una temperatura adecuada, constituyen un papel fundamental en la multiplicación y amplificación de *Legionella* en las redes de abastecimiento de agua potable hasta alcanzar concentraciones infectantes para el ser humano (Lau and Ashbolt, 2009). Por lo tanto, el control del biofilm y de las AVL podría favorecer una prevención más eficaz contra la legionelosis (Stewart et al., 2001; Fields, Benson and Besser, 2002; Schwartz et al., 2003; Borella et al., 2004).

Debido a la alteración producida por el hombre en el medio ambiente, la legionelosis se ha incrementado en los últimos años. Estas bacterias en su estado natural causarían de forma rara una enfermedad en humanos; de hecho, se ha descrito que la presencia de *Legionella* en entornos naturales no parece estar implicada en brotes de legionelosis (Fields, Benson and Besser, 2002). Generalmente, esa infección es una enfermedad adquirida en la comunidad, pero también puede estar asociada a viajes o a neumonías nosocomiales (Vaccaro et al., 2016).

“ Generalmente, esa infección es una enfermedad adquirida en la comunidad, pero también puede estar asociada a viajes o a neumonías nosocomiales. ”

En numerosos estudios se ha evaluado y dado a conocer las diversas condiciones que pueden favorecer el crecimiento y colonización de estas bacterias en instalaciones hidrosanitarias, a las que está expuesta la población de forma cotidiana. Estas bacterias se encuentran en bajas concentraciones en los reservorios naturales y es a través de las Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) cuando alcanza una concentración óptima para la infección (Mercante and Winchell, 2015). En España, en la meseta central, *Legionella* spp. ha sido aislada en el interior de *Acanthamoeba* spp., en el 76% de las muestras de agua procedentes de embalses y baños recreativos (Magnet et al., 2015).

La forma de transmisión más frecuente es la inhalación de aerosoles con agua contaminada, aunque también puede contraerse por aspiración de esta, sobre todo por parte de los pacientes hospitalizados vulnerables, o por la exposición del recién nacido durante los partos en el agua (OMS, 2022). En general, la transmisión entre personas no es común; a pesar de esto, en 2014 se describió por primera vez un posible caso producido por *L. pneumophila* en Portugal (Correia et al., 2016). Por otro lado, se han comunicado casos asociados a la infección extrapulmonar ocasionados por el contacto directo de heridas con agua contaminada con *Legionella* spp. (Lowry et al., 1991).

Estudios epidemiológicos sugieren que *Legionella* es capaz de desplazarse hasta 10 km. en forma de aerosol (Prussin, Schwake and Marr, 2017). La mayoría de las personas sanas expuestas a esta bacteria no llegan a contraer la infección. A pesar de ello, existen factores de riesgo asociados a padecer esta enfermedad: la edad (mayores de 50 años), el sexo (masculino), ser fumadores o exfumadores, personas con enfermedad pulmonar crónica (enfermedad pulmonar obstructiva crónica o enfisema), personas con un SI debilitado debido a enfermedades subyacentes o al tratamiento con diversos fármacos (trasplantados, con cáncer, diabetes o insuficiencia renal) (CDC, 2021; ECDC, 2023).

Se cree que la legionelosis afecta a todas las partes del mundo, pero su incidencia varía considerablemente en función del nivel de vigilancia y de notificación de cada país, ya que muchos países carecen de medios de diagnóstico adecuados, por lo tanto, la tasa de incidencia real se desconoce; se estima que el número real de casos de enfermedad del legionario podría ser de entre 1,8 a 2,7 veces mayor de lo que se notifica. No obstante, teniendo en cuenta que es una enfermedad de declaración obligatoria establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Europa, Australia y EE. UU. se detectan cada año de 10 a 15 casos por cada millón de habitantes, generalmente, con un aumento de casos en el verano y a principios del otoño, aunque puede ocurrir en cualquier época del año (CDC, 2021; OMS, 2022).

“ Se cree que la legionelosis afecta a todas las partes del mundo, pero su incidencia varía considerablemente en función del nivel de vigilancia y de notificación de cada país, ya que muchos países carecen de medios de diagnóstico adecuados, ”

En Europa, el centro ECDC (*European Center for Disease and Prevention*) realiza periódicamente un informe de vigilancia con datos sobre la legionelosis recogidos por una red de 30 países denominada ELDSNet (*European Legionnaires' Disease Surveillance Network*). El último informe realizado en 2021 registró un aumento significativo de casos en la UE/EEE (Unión Europea/Espacio Económico Europeo), siendo la mayor tasa anual de notificación de legionelosis hasta la fecha con más de 10.700 casos notificados y 704 víctimas mortales conocidas, calculándose una tasa de 2,4 casos por cada 100.000 habitantes. Alemania, España, Francia e Italia representaron el 75% de los casos notificados. Dada la tasa de mortalidad relativamente alta y las dificultades para identificar y controlar las fuentes ambientales, es crucial que las autoridades de salud pública se mantengan vigilantes para detectar los brotes (ECDC, 2023).

El mayor número de casos de legionelosis notificados a nivel mundial están producidos por *L. pneumophila* sg-1, ya que los métodos utilizados actualmente para el diagnóstico hospitalario de la legionelosis consisten en la detección específica de esta especie al ser la más frecuente (Muder and Yu, 2002; OMS, 2022; ECDC, 2023). Esto trae como consecuencia que los casos de neumonía producidos por los demás serogrupos de *L. pneumophila* y otras especies de *Legionella* no sean identificados (Muder and Yu, 2002).

En general, España es uno de los países europeos que notifica tasas más elevadas de legionelosis, manteniendo una tendencia creciente hasta el año 2019. Se considera uno de los 4 países europeos con mayor número de casos confirmados de la enfermedad del legionario: en 2019 se notificaron 1.579 casos de los cuales 1.543 fueron autóctonos y 36 fueron casos importados contraídos en otros países; el 70% de los casos de legionelosis fue en hombres y la incidencia aumentó con la edad en ambos sexos (Cano Portero, Martín Mesonero and Amillategui Dos Santos, 2021). Por otra parte, hay que destacar que en España la legionelosis es la tercera causa de infección bacteriana y de mortalidad asociada a la neumonía, y es una de las principales causas de neumonía severa; esto muestra una clara evidencia de la letalidad de esta bacteria en este país (García-Vidal and Carratalà, 2006; Herrera-Lara et al., 2013). La legionelosis adquirida en el hospital tiene una gran importancia ya que puede llegar a alcanzar unas tasas muy altas de mortalidad en individuos inmunocomprometidos y de edad avanzada (OMS, 2022).

Aunque los casos de *Legionella* no-pneumophila son poco frecuentes, es relevante una detección temprana y simultánea de las bacterias del género *Legionella* tanto en el ámbito clínico como ambiental, ya que en los últimos años estos casos de *Legionella* no-pneumophila han aumentado. En aguas de la red hospitalaria en Italia se encontró la presencia de *L. anisa* y *L. bonzemanii* (De Giglio et al., 2023); además en pacientes se ha llegado a encontrar casos de legionelosis producidos por *L. anisa* (Bornstein et al., 1989; Vaccaro et al., 2016); *L. feeleii* se encontró en diversos casos produciendo neumonía y fiebre de Pontiac (Herwaldt et al., 1984; Thacker et al., 1985; Vaccaro et al., 2021) y asociada a pericarditis (Sviri et al., 1997); otras especies como *L. longbeache* y *L. jordanis* también se han visto asociadas a esta enfermedad (Svendsen, Jønsson and Niebuhr, 1987; Grove et al., 2002; Samson and Maze, 2024).

### 1.2.5. Patogénesis de *Legionella*

*Legionella* se encuentra entre los primeros patógenos de las vías respiratorias causantes de neumonía comunitaria y nosocomial en España (García-Vidal and Carratalà, 2006; Vaccaro et al., 2016; Vaccaro et al., 2021), pudiendo alcanzar en este caso tasas de mortalidad superiores al 40% en individuos inmunocomprometidos y de edad avanzada (OMS, 2022). La legionelosis puede manifestarse de dos maneras distintas, como enfermedad del legionario o como fiebre de Pontiac; además de ser causante de neumonía, es responsable de infecciones extrapulmonares (Sviri et al., 1997; Muder and Yu, 2002; McClelland, Vaszar and Kagawa, 2004; Cortés-Sánchez, Espinosa-Chaurand and Díaz-Ramírez, 2018).

Se estima que el 95 % de los individuos expuestos a *Legionella* puede llegar a desarrollar de forma leve la infección, padeciendo la fiebre de Pontiac, y el 5 % restante puede desencadenar en la enfermedad del legionario; esto varía en el caso de los pacientes hospitalizados (Bartram, 2007). *Legionella* desencadena su proceso patológico dependiendo de su habilidad para colonizar, multiplicarse y controlar las vías celulares eucariotas, incluyendo la interacción con el hospedador y los diferentes factores de virulencia (Segal and Shuman, 1999).

Los principales factores de virulencia de *Legionella* son proteínas de superficie, proteínas de choque térmico, citotoxinas, fosfolipasas, lipopolisacáridos, metaloproteasas y compuestos asociados al secuestro del hierro (Bruggemann et al., 2006; Eisenreich and Heuner, 2016). En 1989 se identificó el primer gen asociado a la virulencia, denominado *macrophage infectivity potentiator* (*mip*), el cual codifica para una proteína de superficie de 24 kDa indispensable en los estadios tempranos de la infección en los macrófagos; esta proteína está conservada en todas las especies de *Legionella* por lo que se utiliza para la detección de este género en muestras clínicas y ambientales (Cianciotto and Fields, 1992; Wellinghausen, Frost and Marre, 2001; Fields, Benson and Besser, 2002; Wilson et al., 2003).

Por otra parte, cabe destacar cómo *Legionella* spp. produce manifestaciones extrapulmonares, ya sea en presencia o ausencia de neumonía, produciendo: inflamación de las membranas que recubren el corazón (pericarditis, miocarditis y endocarditis), ruptura del bazo, artritis, osteomielitis, infecciones cutáneas y del SNC (Heath et al., 1986; Svendsen, Jønsson and Niebuhr, 1987; Bornstein et al., 1989; Sviri et al., 1997; McClelland, Vaszar and Kagawa, 2004; Padrnos et al., 2014; Compain et al., 2015; Grimstead et al., 2015; Coronel et al., 2016; Huang et al., 2019; Halilu and Hauptman, 2023; Samson and Maze, 2024).

### 1.2.5.1. Fiebre de Pontiac

#### 1.2.5.1.1. Características de la fiebre de Pontiac

La fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda de resolución espontánea en la que no se conocen casos de defunción. Tiene un periodo de incubación corto, entre 5 y 72 horas desde el contacto con el foco de infección. A su vez, los síntomas duran poco tiempo, entre 2 y 7 días, siendo una enfermedad autolimitante, sin llegar a producir neumonía. Los síntomas son similares a los de la gripe, con fiebre, escalofríos, dolor muscular, cansancio, disnea y tos seca, en ocasiones acompañados de problemas intestinales tales como náuseas, vómitos y diarrea (Cordes and Fraser, 1980; Tossa et al., 2006; Bartram, 2007; Cortés-Sánchez, Espinosa-Chaurand and Díaz-Ramírez, 2018).

Su patogénesis no es del todo conocida, sugiriéndose que las manifestaciones clínicas ocurren posiblemente debido a la exposición a endotoxinas de la bacteria, siendo la virulencia dependiente de la especie y del SI de la persona infectada (Friedman et al., 1987; Tossa et al., 2006; Bartram, 2007).

#### 1.2.5.1.2. Diagnóstico de la fiebre de Pontiac

Esta enfermedad se produce mayoritariamente en jóvenes con una media de edad de 30 años. En raras ocasiones se llega a diagnosticar de forma aislada; esto se debe a que, al tener una sintomatología inespecífica y autolimitante, la sospecha clínica es escasa (Cordes and Fraser, 1980; Phin et al., 2014). Sin embargo, la identificación de casos aislados puede ser significativa como marcador de contaminación ambiental por *Legionella* spp., llegando así a localizar posibles fuentes de infección y poder tomar las medidas preventivas frente a posibles brotes de la enfermedad del legionario (Tossa et al., 2006).

No existen métodos específicos de diagnóstico ya que en la radiografía de tórax no se observan cambios morfológicos (Wang et al., 2015; Cunha, Burillo and Bouza, 2016). Por lo tanto, su diagnóstico se realiza mediante serología, aunque la sensibilidad de los métodos serológicos sea variable y eventualmente no-específicos. La única forma de demostrar esta infección es a través del análisis de un gran número de personas expuestas a una misma fuente sospechosa de infección, comparando sus niveles serológicos con los niveles de un grupo control (Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

### 1.2.5.1.3. Tratamiento de la fiebre de Pontiac

Al ser una enfermedad autolimitada no requiere ni se ha demostrado el uso de ningún tratamiento específico contra esta infección; la forma no pulmonar de la infección remite espontáneamente y no necesita intervención médica, ni el uso de antibióticos (OMS, 2022).

## 1.2.5.2. Enfermedad del legionario

### 1.2.5.2.1. Características de la enfermedad del legionario

La enfermedad del legionario, o también conocida como legionelosis, presenta variaciones en cuanto a su gravedad, desde afecciones leves que cursan con fiebre y tos leve a neumonías mortales. Estas infecciones se clasifican en función de la forma de adquisición en: extrahospitalarias (comunitarias), nosocomiales (hospitalarias) o viajeras (CDC, 2021).

- Infección adquirida en la comunidad: ocurre en aquellos individuos que no han sido hospitalizados recientemente. Se caracteriza por ser una infección aguda del parénquima pulmonar producida por una fuente de infección que está relacionada con las instalaciones de la zona residencial, del trabajo o de lugares visitados por el paciente (Bartram, 2007).
- Infección nosocomial: ocurre cuando el paciente desarrolla una neumonía 48 horas después de haber sido hospitalizado, dentro de las primeras 72 horas tras el alta o 10 días después tras estar en el hospital (Society and America, 2005; Bartram, 2007). Principalmente afecta a personas de edad avanzada, pacientes en cuidados intensivos, aquellos que requieren ventilación mecánica, personas que han recibido un trasplante y/o aquellos con una estancia prolongada en el hospital (Bartram, 2007; Sakhaee et al., 2022; McGinnis et al., 2023). La infección se produce cuando *Legionella* coloniza los sistemas de distribución de agua en hospitales o centros de atención médica, lo que conlleva su propagación a través de equipos como respiradores artificiales, nebulizadores, catéteres, torres de refrigeración, u otros dispositivos similares (Kool et al., 1999; Schaumann et al., 2001; Marinelli et al., 2017; Optenhövel, Mellmann and Kuczius, 2023). La enfermedad del legionario adquirida en el hospital es menos frecuente que los casos adquiridos en la comunidad. Sin embargo, sigue siendo un problema significativo de salud pública debido a su alta tasa de morbilidad y mortalidad, requiriendo una atención médica más intensiva, especialmente en los pacientes inmunocomprometidos (Patterson et al., 1997; Erat et al., 2020; Deiana et al., 2021; Ghorbani et al., 2021; Bavari et al., 2022; Humphreys, O'Donovan and Dwyer, 2022; Ishikawa et al., 2022).
- Infección asociada a viajeros: sucede en aquellos individuos que han viajado (hoteles, zonas de acampadas, apartamentos, cruceros, etc.) en los 10 días previos al inicio de la sintomatología (Bartram, 2007; Gea-Izquierdo, 2018; ECDC, 2023). Suele ocurrir en personas mayores de 60 años, siendo menos frecuente que la infección comunitaria. A pesar de ello, en Europa se describen más de 800 casos de la enfermedad del legionario asociados a viajes anualmente (ECDC, 2023).

Esta enfermedad tiene un periodo de incubación de 2 a 10 días, aunque en algunos brotes se han registrado periodos de hasta 16 días. Los síntomas iniciales son fiebre, pérdida de apetito, cefalea, dificultad para respirar, malestar general, dolor muscular y letargo (CDC, 2021). También se puede asociar a síntomas gastrointestinales (diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, etc.) y neurológicos (confusión, depresión, alucinaciones, delirio, etc.) que pueden aparecer entre el 25 y 50% de los casos. En la mayoría de los casos, es indispensable la hospitalización del individuo infectado (Bartram, 2007; Cunha, Burillo and Bouza, 2016). Generalmente, se observa una tos leve inicial, presentando flemas en el 50% de los pacientes; en un tercio de los pacientes los esputos van acompañados de sangre. Estos síntomas pueden conllevar a una neumonía progresiva atípica que puede asemejarse a una neumonía neumocócica en sus hallazgos clínicos y radiográficos; esta neumonía se acompaña de insuficiencia respiratoria y/o insuficiencia multiorgánica, llegando a causar la muerte del paciente. Si existe retraso en el diagnóstico y ausencia de tratamiento, la legionelosis suele agravarse en la primera semana (CDC, 2021; OMS, 2022).

La tasa de mortalidad por legionelosis depende de la gravedad de la enfermedad, el tratamiento antimicrobiano inicial, el lugar donde se contrajo la infección y diversos factores relacionados con el hospedador. En conjunto, la tasa de mortalidad oscila entre un 5% y un 10%; en las personas inmunocomprometidas sin tratamiento puede alcanzar el 40% llegando incluso al 80%, aunque puede verse reducida de un 5% a un 30% si es tratada correctamente y en función de la gravedad de los signos y síntomas clínicos. Aunque se desconoce cuál es la dosis infectante, existe el contagio de personas vulnerables a bajas concentraciones de la bacteria, tras tiempos de exposición muy breves y a distancias de hasta 3 km. o más del foco infeccioso (OMS, 2022).

La especie que causa mayor daño en el hombre es *L. pneumophila*, encontrándose en ecosistemas de agua de todo el mundo. No obstante, los sistemas acuáticos artificiales son más peligrosos, puesto que son lugares propicios para el crecimiento y la propagación de *Legionella*. Además de esta especie, otras *Legionella* no-pneumophila son capaces de producir daño pulmonar como es el caso de *L. feeleii*, distribuida ampliamente en reservorios acuáticos. Aun así, hasta ahora se han notificado pocos casos de la enfermedad del legionario producidos por esta especie debido a la falta de un método diagnóstico rutinario para su detección en el área clínica, unido al hecho de presentar un menor grado de patogenicidad con respecto a *L. pneumophila* (Palutke et al., 1986; Svirni et al., 1997; Vaccaro et al., 2021).

Cabe destacar la amplia detección de *L. feeleii* como una de las especies de *Legionella* más frecuente en las piscinas naturales de la zona centro de España, además de su diagnóstico en pacientes con infección pulmonar y extrapulmonar grave (Svirni et al., 1997; Wang et al., 2015; Vaccaro et al., 2021). La presencia de esta especie en el medio ambiente ha dado lugar al interés de comprender cuál es el riesgo sanitario para el hombre, ya que se ha descrito, como agente causal de la fiebre de Pontiac y de la enfermedad del legionario (Muder and Yu, 2002; Siegel et al., 2010; Vaccaro et al., 2021).

“ La especie que causa mayor daño en el hombre es *L. pneumophila*, encontrándose en ecosistemas de agua de todo el mundo. ”

Hay que destacar que *L. feeleii* es capaz de producir neumonías más severas en el hombre, debido a una activación exacerbada del SI, produciendo altas concentraciones de citoquinas expresadas ante la infección de esta especie; a esto se añade que *L. feeleii* en comparación con *L. pneumophila* carece de los mismos mecanismos para evadir este SI (Gomes et al., 2018). Este dato puede sugerir que *L. feeleii* sea capaz de activar mecanismos de patogenicidad tras el paso por *Acanthamoeba* convirtiéndola en una cepa más adaptada para la infección de otros organismos eucariotas (Wang et al., 2015; Dos Santos Gomes, 2017). Wang et al. (2015) han descrito diferencias en la virulencia de cepas de *L. feeleii* de pacientes con fiebre de Pontiac y con enfermedad del legionario, teniendo mayor capacidad de infección y efectos citopáticos sobre los macrófagos las cepas provenientes de la enfermedad del legionario.

Teniendo en cuenta esto, posiblemente, *L. feeleii* podría considerarse una especie más patogénica de lo que realmente se piensa, pero la incidencia detectada de estas infecciones es relativamente baja debido a la ausencia de un buen diagnóstico; esto es un factor que debe tenerse en cuenta a la hora de establecer o revisar las medidas de control y prevención de la legionelosis. Se ha demostrado que *L. feeleii* es un microorganismo frecuente en nuestro medio, detectándose mediante PCR, cultivo y co-cultivo con *Acanthamoeba*, por lo que debería recomendarse su inclusión en los kits de diagnóstico (Magnet et al., 2015; Vaccaro et al., 2021).

### 1.2.5.2.2. Características de la enfermedad del legionario

La enfermedad del legionario no se puede diferenciar de otras neumonías a través del diagnóstico clínico o radiológico. Por ello, es imprescindible realizar otros métodos de diagnóstico de laboratorio, entre ellos se encuentran el cultivo, análisis serológico, PCR o test de antígenos en orina (Blyth, Adams and Chen, 2009; Viasus et al., 2022).

El cultivo de muestras del tracto respiratorio inferior es el método de referencia para el diagnóstico de esta enfermedad, observándose el crecimiento de las colonias en agar BCYE con L-cisteína (Fields, Benson and Besser, 2002).

El análisis sanguíneo muestra leucocitosis con neutrofilia, valores elevados de la velocidad de eritrosedimentación, disminución del sodio y fósforo sérico, así como un aumento de los niveles de la proteína C reactiva, ferritina y LDH sérica (lactato deshidrogenasa), además puede llegar a aparecer hematuria (Bartram, 2007; Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

Según el informe del ECDC, el 90% de los casos en Europa se diagnostican utilizando el método de la prueba de antígeno en orina (ECDC, 2023). Sin embargo, ello puede representar un problema ya que puede dar falso-negativos puesto que este tipo de pruebas no permiten la detección de serogrupos de *L. pneumophila* que no pertenecen al serogrupo-1, ni de otras especies de *Legionella* (Fields, Benson and Besser, 2002; Vaccaro et al., 2016). Desafortunadamente, en muchos hospitales el diagnóstico se basa solamente en la detección de antígeno en orina y pocos casos llegan a confirmarse por cultivo. Por lo que como se indicó previamente, la notificación de casos de legionelosis en el mundo suele estar subestimada (Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

“*Desafortunadamente, en muchos hospitales el diagnóstico se basa solamente en la detección de antígeno en orina y pocos casos llegan a confirmarse por cultivo.*”

Otros métodos utilizados para la detección de *Legionella* son las técnicas de microscopía, el cultivo, el análisis bioquímico, el análisis del perfil de ácidos grasos, el patrón de bandas proteicas, las pruebas de aglutinación por látex, las técnicas serológicas o la detección del ADN por PCR. El diagnóstico microscópico mediante la tinción de Gram u otro tipo de tinciones es complicado, sin embargo, las técnicas de inmunofluorescencia facilitan la visualización de las bacterias, aunque la sensibilidad de esta técnica puede variar (Ausina et al., 2005; Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

La detección de ADN específico de *Legionella* a través del uso de técnicas de PCR es un método diagnóstico prometedor, que posee una gran sensibilidad y especificidad, pudiendo detectar casi todas las especies de *Legionella*. La sensibilidad varía en función de la calidad y el momento de la recogida de las muestras clínicas, así como de la habilidad técnica del personal de laboratorio que realiza la prueba (Viasus et al., 2022; ECDC, 2023). En la Tabla 6 se muestran las ventajas, desventajas, junto con los porcentajes de sensibilidad y especificidad según el método diagnóstico.

Método de detección (Tipo de muestra)	Ventajas	Desventajas	% Sensibilidad	% Especificidad
Cultivo  (Secreciones de las vías respiratorias, tejido pulmonar, líquido pleural, sangre, muestras ambientales)	Técnica de referencia y confirmatoria  Detecta la mayoría de las especies y serogrupos de <i>Legionella</i>  Pueden compararse aislados clínicos y ambientales  Las bacterias contaminantes no afectan negativamente al aislamiento de <i>Legionella</i> en medios selectivos	Técnica difícil que requiere experiencia  Lentitud del crecimiento (5 días)  Necesidad de medios selectivos (BCYE L-cisteína)  Depende de la disponibilidad de la muestra	20 - 80 %	100 %
Antígeno en orina  (Orina)	Bajo coste  Procedimiento sencillo  Muestras sencillas de obtener (orinas)	Sólo detecta antígenos de <i>L. pneumophila</i> sg 1. Se han mostrado reacciones cruzadas con otros serogrupos o especies  Valor predictivo, debería confirmarse mediante cultivo	70 - 100 %	95 - 100 %

Tabla 6. Métodos de detección de *Legionella* spp. Detección de *Legionella* según el tipo de muestras, ventajas y desventajas (Mercante and Winchell, 2015; CDC, 2021; Viasus et al., 2022).

Método de detección (Tipo de muestra)	Ventajas	Desventajas	% Sensibilidad	% Especificidad
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)  (Secreciones respiratorias bajas, tejido pulmonar, líquido pleural, orina, muestras ambientales)	Detecta todas las especies conocidas  Especificidad y sensibilidad (aproximada del 90%)  Técnica rápida  Prueba confirmatoria	Los ensayos varían según el laboratorio y la disponibilidad comercial puede ser limitada  Requiere personal cualificado y tecnologías sofisticadas	95 - 99 %	>99 %
Inmunofluorescencia directa de anticuerpos  (Secreciones de las vías respiratorias, tejido pulmonar, sangre)	Puede realizarse en muestras patológicas (normalmente tejido pulmonar)  Detecta diferentes especies y serogrupos	Requiere personal cualificado y tecnologías sofisticadas con reactivos difíciles de obtener	25 - 75 %	>95 %
Serología  (Suero)	Detecta diferentes especies y serogrupos  Prueba confirmatoria	Sueros desde el inicio de la infección hasta 3 a 6 semanas después de los síntomas  Aproximadamente entre el 5 y el 10% de la población tiene un título $\geq 256$  Difícil diferenciar de otras neumonías	80 - 90 %	>99 %

Continuación Tabla 6. Métodos de detección de *Legionella* según el tipo de muestras, ventajas y desventajas (CDC, 2021; Mercante & Winchell, 2015; Viasus et al., 2022).

### 1.2.5.2.3. Tratamiento de la enfermedad del legionario

Actualmente, no se dispone de ninguna vacuna contra la legionelosis. El tratamiento se realiza mediante antibióticos con la completa recuperación del paciente, aunque este puede prolongarse durante varios meses produciendo fatiga, síntomas neurológicos y neuromusculares, e incluso trastorno de estrés postraumático (Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

Los antibióticos utilizados deben actuar a nivel intracelular indistintamente de la especie de *Legionella* implicada en la infección; como los macrólidos, fluoroquinolonas y ciclinas, estos son efectivos a diferencia de los  $\beta$ -lactámicos y los aminoglucósidos, ya que *Legionella* es un microorganismo intracelular y productor de  $\beta$ -lactamasas (Phin et al., 2014; Mercante and Winchell, 2015; Cunha, Burillo and Bouza, 2016).

Inicialmente, la eritromicina fue el fármaco de elección durante muchos años, sin embargo, se han descrito fallos en el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos. Numerosos estudios han demostrado una mayor eficiencia *in vitro* de las fluoroquinolonas en comparación con estos macrólidos. Posteriormente, surgieron nuevos macrólidos con una eficacia comparable a la de las fluoroquinolonas, demostrando, en ocasiones, mejores desenlaces, como es el uso del levofloxacin (quinolona) o la azitromicina (macrólido), actualmente antibióticos de elección (García-Vidal and Carratalà, 2006; Nagel et al., 2014; Viasus et al., 2022).

“Numerosos estudios han demostrado una mayor eficiencia *in vitro* de las fluoroquinolonas en comparación con estos macrólidos.

”

La duración óptima del tratamiento antibiótico para la legionelosis no se ha establecido, y puede variar en función del agente antimicrobiano utilizado, la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente ante el tratamiento. Aun así, la duración recomendada es de 3 a 7 días, hasta que el paciente esté clínicamente estable y afebril durante al menos 48 horas. Sin embargo, existen tratamientos prolongados para pacientes inmunocomprometidos, o con complicaciones, recomendando levofloxacin o azitromicina durante 21 días; y para pacientes con neumonía grave o comorbilidades crónicas, recomendando estos fármacos durante 7-10 días (Lanternier et al., 2017; Viasus et al., 2022).

Recientemente se ha publicado el desarrollo de la omadaciclina como un antibiótico de amplio espectro que puede ser utilizado en pacientes con neumonía comunitaria, siendo capaz de resolver infecciones causadas por *Legionella* spp. (Dubois, Dubois and Martel, 2020; Davis et al., 2023).

“La duración óptima del tratamiento antibiótico para la legionelosis no se ha establecido, y puede variar en función del agente antimicrobiano utilizado, la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente ante el tratamiento.

”

### 1.2.6. Detección de *Legionella* en muestras ambientales

Como se ha comentado, *Legionella* es una bacteria Gram-negativa que se encuentra de forma ubicua en ambientes acuáticos, detectándose, en numerosos estudios, en muestras ambientales. *Legionella* spp. puede mantenerse y multiplicarse fácilmente en agar BCYE suplementado con L-cisteína; también es capaz de cultivarse sobre las AVL (Fields, Benson and Besser, 2002). Su detección también puede realizarse, como ya se ha comentado, mediante PCR. Algunos ejemplos de detección de *Legionella* en muestras ambientales se recogen en la Tabla 7.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Agua caliente residencial	Cultivo, microscopía, test de aglutinación y PCR	Italia	(Borella <i>et al.</i> , 2004)
Agua caliente de hoteles y hospitales	Cultivo	Italia	(Leoni <i>et al.</i> , 2005)
Agua hospitales y casas, hoteles, oficinas, iglesias, gimnasios, piscinas y colegios	Cultivo	Italia	(Napoli <i>et al.</i> , 2010)
Agua ambiental	Microscopía, tinción, cultivo y PCR	Francia	(Campocasso <i>et al.</i> , 2012)
Agua de hoteles y residencias de ancianos	Cultivo	Cataluña, España	(Serrano-Suárez <i>et al.</i> , 2013)
Agua de ETAP, EDAR y piscinas naturales	Cultivo, co-cultivo con <i>Acanthamoeba</i> y PCR	España	(Magnet <i>et al.</i> , 2015)
Agua potable de los sistemas de distribución	PCR	EE. UU.	(Lu <i>et al.</i> , 2016)
Agua de riego, residuales y de EDAR	PCR	EE. UU.	(Kulkarni <i>et al.</i> , 2018)
Agua de spas , fuentes y baños públicos	Cultivo, PCR, inmunoaglutinación con sueros inmunes	Japón	(Nishida <i>et al.</i> , 2019)
Agua de ETAP	Cultivo, co-cultivo con <i>Acanthamoeba</i> y PCR	España	(Gomes <i>et al.</i> , 2020)
Agua de riego	PCR	Fuerteventura, España	(Rusinol <i>et al.</i> , 2020)

Tabla 7. Ejemplos de detección de *Legionella* en muestras ambientales acuáticas en los últimos años.

Por otra parte, numerosos estudios en agua de diferentes áreas de los hospitales han mostrado una alta presencia de *Legionella*. Algunos de estos estudios se muestran en la Tabla 8.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Tuberías y torres sistemas de agua de los hospitales	Cultivo, tinción y microscopía	París, Francia	(Nahapetian <i>et al.</i> , 1991)
Agua caliente del área de enfermería de la UCI neonatal	Cultivo Inmunofluorescencia y PCR	Alemania	(Lück <i>et al.</i> , 1994)
Agua del área de trasplantes	Cultivo	Reino Unido	(Patterson <i>et al.</i> , 1997)
Agua potable de hospitales	Cultivo y genotipado	Cataluña, España	(Sabrià <i>et al.</i> , 2001)
Agua del área de neonatología	Cultivo, hibridación de ADN y amplificación aleatoria de ADN polimórfico	Japón	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2003)
Aguas de hospitales	Cultivo, genotipado	Finlandia	(Perola <i>et al.</i> , 2005)
Agua caliente, duchas, tanques de agua y torres de refrigeración de hospitales	Cultivo	Francia	(Lasheras <i>et al.</i> , 2006)
Agua de hospitales	Cultivo y inmunofluorescencia directa	EE. UU.	(Stout <i>et al.</i> , 2007)
Agua de hospitales	Electroforesis en gel de campo pulsado	Barcelona, España	(García-Nuñez <i>et al.</i> , 2008)
Agua de hospitales	Cultivo, electroforesis en gel de campo pulsado	Alemania	(Oberdorfer, Müssigbrodt and Wendt, 2008)
Agua potable de hospitales	Cultivo	Taiwán	(Yu <i>et al.</i> , 2008)
Agua de duchas y grifos de la UCI	Cultivo y PCR	India	(Yaslianifard <i>et al.</i> , 2012)

Tabla 8. Ejemplos de detección de *Legionella* en muestras ambientales acuáticas en los últimos años.

Tipo de muestra	Método de detección	Ciudad/País	Autor/año
Aguas de hospitales	Cultivo, PCR, secuenciación y serotipado	Polonia	(Pancer <i>et al.</i> , 2013)
Agua bruta y tanque de agua del sistema de hemodiálisis	Cultivo y PCR	Irán	(Nazemi <i>et al.</i> , 2016)
Agua de hospitales	Serotipado, MALDITOF y electroforesis	Cataluña, España	(Graells <i>et al.</i> , 2018)
Agua de hospitales	Cultivo y genotipado	Japón	(Nakamura <i>et al.</i> , 2020)
Agua de hospitales	Cultivo y PCR	Irán	(Bavari <i>et al.</i> , 2022)
Agua de unidades dentales	MALDITOF.	Alemania	(Optenhövel, Mellmann and Kuczius, 2023)
Agua de hospitales	Citometría de flujo y PCR	Australia	(Nisar <i>et al.</i> , 2023)
Agua del aire acondicionado de diferentes áreas y de la zona de operaciones	Cultivo	India	(Gaur <i>et al.</i> , 2023)
Agua caliente de los sistemas de hospitales	Cultivo	Grecia	(Mavridou <i>et al.</i> , 2008; Fragou <i>et al.</i> , 2012)
Agua caliente de hospitales y residencias de ancianos	Cultivo	Polonia	(Sikora <i>et al.</i> , 2015; Szczepanek <i>et al.</i> , 2023)
Agua de hospitales	Cultivo, aglutinación de látex y electroforesis en gel de campo pulsado	Italia	(Leoni <i>et al.</i> , 2005; Ditommaso <i>et al.</i> , 2006; Pignato <i>et al.</i> , 2006; Napoli <i>et al.</i> , 2010; Tesauro <i>et al.</i> , 2010; Iatta <i>et al.</i> , 2013; Laganà <i>et al.</i> , 2014; Deiana <i>et al.</i> , 2021; Lombardi <i>et al.</i> , 2023)
Agua de hospitales	Cultivo, electroforesis en gel de campo pulsado y citometría	Barcelona, España	(Párraga-Niño <i>et al.</i> , 2024)

Continuación Tabla 8. Ejemplos de detección de *Legionella* en muestras de agua hospitalaria en los últimos años.

### 1.2.7. Prevención y control de Legionella

La enfermedad del legionario posee una gran importancia en la salud pública por su elevada morbimortalidad, considerándose una enfermedad de declaración obligatoria, según la OMS (OMS, 2022). En concreto, la legionelosis se incluye como enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional en España en el año 1997 con el Real Decreto- Ley 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Real-Decreto Ley 2210/1995).

Las comprobaciones periódicas para detectar la presencia de *Legionella* y las medidas de control adecuadas pueden prevenir los casos de legionelosis en entornos en los que la población pueda estar expuesta a aerosoles que contengan la bacteria. La localización de posibles fuentes de infección y/o la identificación de los brotes de legionelosis permiten poner en marcha las medidas correctoras para la eliminación de la fuente de infección y la aplicación de los protocolos de prevención en la población (Ausina et al., 2005). El CDC recomienda estrategias centradas en el mantenimiento adecuado de los sistemas de agua, el análisis universal apropiado de los pacientes con neumonía nosocomial y la investigación de los focos de infección. A pesar de ello, las medidas de prevención no se aplican adecuadamente en la mayoría de los centros sanitarios (Fields, Benson and Besser, 2002).

La correcta prevención de la legionelosis consiste en aplicar estas medidas de control para reducir al mínimo la proliferación de *Legionella* y la difusión de aerosoles contaminados, entre estas medidas está el buen mantenimiento de los sistemas de distribución del agua, así como de los aparatos utilizados en el hospital, mediante su limpieza y desinfección sistemáticas, y la aplicación de otras medidas físicas (térmicas) o químicas (biocidas) para limitar al máximo la proliferación bacteriana (OMS, 2022).

“ la legionelosis se incluye como enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional en España en el año 1997 con el Real Decreto- Ley 2210/1995, de 28 de diciembre, ”

Dichas medidas descritas en el ECDC (2023) deben:

- Garantizar el mantenimiento, la limpieza y la desinfección periódica de los sistemas de agua, incluidos los sistemas de fontanería, las torres de refrigeración, las bañeras de hidromasaje y las fuentes decorativas.
- Mantener los sistemas de agua fría por debajo de 20°C y los de agua caliente por encima de 50°C, para evitar la proliferación bacteriana.
- Garantizar el flujo y la circulación adecuados del agua en los sistemas de agua para minimizar el riesgo de agua estancada.
- Desinfectar los sistemas de agua caliente con altos niveles de cloro (50 mg/L) durante 2-4 horas después de trabajar con el sistema, y antes del comienzo de cada estación cálida.
- Garantizar la limpieza y desinfección periódica con agentes biocidas, de los filtros de agua, las torres de refrigeración y las tuberías asociadas utilizadas en los sistemas de aire acondicionado.
- Instalar mecanismos para reducir la difusión de aerosoles de las torres de enfriamiento.

La aplicación de este tipo de medidas contribuye a reducir el riesgo de contaminación por *Legionella* y a prevenir la aparición tanto de casos esporádicos como de brotes. Las medidas de control y prevención se deben acompañar de la debida vigilancia de los pacientes por parte de los médicos generales y los servicios comunitarios de salud, y así facilitar la detección de casos (OMS, 2022).

Existen programas y leyes vigentes para la prevención y control de la legionelosis a nivel internacional (Bartram, 2007; ECDC, 2023). En España, a pesar de que diferentes comunidades autónomas cuentan con legislación específica para el control de *Legionella*, la prevención y control de la enfermedad a nivel nacional está legislada por las siguientes leyes:

- Real Decreto 3/2023, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro.
- Real Decreto 487/2022, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis.
- Real Decreto 902/2018 por el que se establecen los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano.
- Real Decreto 742/2013, por el que se establecen los criterios técnico- sanitarios de las piscinas.
- Real Decreto 1620/2007, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- Real Decreto 1027/2007, por el que se aprueba el Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios.
- Real Decreto 1299/2006, por el que se aprueba el cuadro de enfermedades profesionales en el sistema de la Seguridad Social y se establecen criterios para su notificación y registro.
- Real Decreto 664/1997, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto 2210/1995, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica.

Las normas europeas a seguir son:

- Reglamento (UE) 2022/2370 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de noviembre de 2022 que modifica el Reglamento (CE) n.º 851/2004 por el que se crea un Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades.
- Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Reglamento (UE) 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua.
- Decisión de Ejecución (UE) 2018/945 de la Comisión, de 22 de junio de 2018, sobre enfermedades transmisibles y problemas sanitarios especiales relacionados que deben estar sujetos a vigilancia epidemiológica, así como las definiciones de casos pertinentes.

Numerosos estudios han evaluado la eficacia de estas leyes, considerándose que pueden no proteger suficientemente, sin llegar a minimizar el riesgo en la población, especialmente en centros sanitarios donde se asiste a pacientes inmunocomprometidos. Teniendo en cuenta esto, se han planteado nuevas medidas en las prácticas de saneamiento de los sistemas de agua, evaluándose el riesgo relacionado con el suministro de agua en los hospitales y otras instalaciones sanitarias periódicamente (Spagnolo et al., 2016).

En la Tabla 9 se señalan aquellos aspectos que se deben valorar a la hora de la prevención de *Legionella*, y las propuestas realizadas por diferentes autores a la hora de poder mejorar este problema.

ASPECTOS PARA VALORAR	SOLUCIONES PROPUESTAS
<p><i>Legionella</i> es capaz de protegerse y transmitirse a través de las Amebas de Vida Libre y el <i>biofilm</i>, no contemplados en las leyes. Por lo que son capaces de sobrevivir en diversas condiciones físicas y químicas. (Hilbi, Hoffmann and Harrison, 2011; Nisar et al., 2020).</p>	<p>Contemplar en las leyes la presencia de las Amebas de Vida Libre por PCR en especial <i>Acanthamoeba</i>, ya que sirve de reservorio de otros patógenos. Monitorización constante del agua, de sus patógenos y biocidas. Realizar una desinfección más eficaz con un aumento de pH y cambios en la osmolalidad, que inhiba la formación de <i>biofilm</i> (Magnet et al., 2015; Gomes et al., 2020; Vaccaro et al., 2021).</p>
<p>Algunos factores externos hacen que <i>Legionella</i> se transforme en células viables no cultivables, pudiendo sobrevivir a algunas estrategias de desinfección (Bédard et al., 2015). <i>Legionella no-pneumophila</i> es capaz de producir enfermedades nosocomiales (Vaccaro Muñoz, 2017).</p>	<p>Contemplar en las leyes la presencia de las <i>Legionella</i> viables pero no cultivables por PCR (Dusserre et al., 2008; Marinelli et al., 2017). Contemplar no solo la detección por PCR de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i> en las muestras de agua, sino incluir también la presencia de <i>Legionella no-pneumophila</i> como es el caso de <i>L. feeleii</i> (Vaccaro Muñoz, 2017).</p>
<p>El tratamiento térmico es uno de los métodos más utilizados para la desinfección de los suministros de agua hospitalaria, pero que no llega a ser adecuado para la eliminación del quiste de <i>Acanthamoeba</i> y de las bacterias de <i>Legionella</i> en asociación con estos quistes (Loret and Greub, 2010; Cervero-Aragó et al., 2015; Muchesa et al., 2016; Nisar et al., 2020; Bavari et al., 2022).</p>	<p>Aplicación de medidas por choque térmico o hipercloración cuando se encuentre un foco de infección por <i>Legionella</i>. El uso de la monocloramina para el control de <i>Legionella</i> (Marchesi et al., 2013).</p>

Tabla 9. Principales problemas y sus posibles soluciones ante la contaminación de los sistemas de agua por parte de *Legionella* y *Acanthamoeba*.

ASPECTOS PARA VALORAR	SOLUCIONES PROPUESTAS
<p>Las Amebas de Vida Libre y <i>Legionella</i> son responsables de infecciones nosocomiales (Martinez and Visvesvara, 1997; Carlesso et al., 2010; Lasjerdí et al., 2015).</p> <p>Los sistemas de agua de los hospitales están mal diseñados, promoviendo la multiplicación de las AVL y <i>Legionella</i> en los tanques de agua (Graells et al., 2018).</p> <p>Ningún método de desinfección es totalmente eficaz y seguro (Casini et al., 2014).</p>	<p>Detección de enfermedades nosocomiales adquiridas por el agua, para la prevención de brotes.</p> <p>Programa de gestión de limpieza periódica (que no sea exclusivamente en verano), y que sea actualizada constantemente. Limpieza de tanques y tuberías. Realización de buenas prácticas higiénicas en los hospitales realizadas por el personal hospitalario y los pacientes. Utilización de agua estéril para beber, lavarse los dientes, enjuagar las sondas nasogástricas y limpiar los nebulizadores y otros equipos de cuidados respiratorios (Tablan et al., 2004; CDC, 2019; CDC, 2021).</p> <p>Realizar reuniones frecuentes para tomar nuevas medidas de prevención en las que participen epidemiólogos sanitarios y responsables de seguridad hospitalaria, arquitectos de instalaciones e ingenieros de mantenimiento, así como los clínicos y el laboratorio de microbiología (Graells et al., 2018).</p> <p>Uso de filtros menores de 0,2 µm en los sistemas de diálisis así como en los grifos de las áreas con pacientes inmunocomprometidos como puede ser la de trasplantes, la UCI o neumología pediátrica.</p>

Continuación Tabla 9. Principales problemas y sus posibles soluciones ante la contaminación de los sistemas de agua por parte de *Legionella* y *Acanthamoeba*.

## 2 BIBLIOGRAFÍA

1. Abedi, B., Azadi, D., Hajhossein, R., Khodashenas, S., Ghaffari, K. and Mosayebi, M. (2021) 'Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. from hospital dust and soil of Khomein, Iran, as reservoir for nosocomial infection', *Parasite epidemiology and control*, 15, pp. e00224.
2. Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., Hoppenrath, M., James, T. Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D. J. G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., Mann, D. G., Massana, R., Mitchell, E. A. D., Morrow, C., Park, J. S., Pawlowski, J. W., Powell, M. J., Richter, D. J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F. W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V. and Zhang, Q. (2019) 'Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of Eukaryotes', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), pp. 4-119.
3. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. and Taylor, M. F. (2005) 'The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), pp. 399-451.
4. Ajami, B., Ghazvini, K., Movahhed, T., Ariaee, N., Shakeri, M. and Makarem, S. (2012) 'Contamination of a dental unit water line system by *Legionella pneumophila* in the mashhad school of dentistry in 2009', *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 14(6), pp. 376-8.
5. Al-Herrawy, A. Z. and Gad, M. A. (2017) 'Assessment of two Different Drinking Water Treatment Plants for the Removal of Free-living Amoebae, Egypt', *Iranian Journal of Parasitology*, 12(3), pp. 413-422.
6. Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C. and Frère, J. (2008) 'Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment', *Current Microbiology*, 57(5), pp. 497-502.
7. Alli, O. A., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M. and Abu Kwaik, Y. (2000) 'Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*', *Infection and Immunity*, 68(11), pp. 6431-40.
8. Allombert, J., Fuche, F., Michard, C. and Doublet, P. (2013) 'Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a *Legionella pneumophila* replicative niche in phagocytic cells', *Microbes and Infection*, 15(14-15), pp. 981-8.
9. Anaissie, E. J., Penzak, S. R. and Dignani, M. C. (2002) 'The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action', *Archives of Internal Medicine*, 162(13), pp. 1483-92.
10. Anand, C. M., Skinner, A. R., Malic, A. and Kurtz, J. B. (1983) 'Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*)', *The Journal of hygiene*, 91(2), pp. 167-78.
11. Arnalich-Montiel, F., Jaumandreu, L., Leal, M., Valladares, B. and Lorenzo-Morales, J. (2013a) 'Scleral and intraocular amoebic dissemination in *Acanthamoeba keratitis*', *Cornea*, 32(12), pp. 1625-1627.
12. Arnalich-Montiel, F., Lorenzo-Morales, J., Irigoyen, C., Morcillo-Laiz, R., López-Vélez, R., Muñoz-Negrete, F., Piñero, J. E. and Valladares, B. (2013b) 'Co-isolation of *Vahlkampfia* and *Acanthamoeba* in *Acanthamoeba*-Like Keratitis in a Spanish Population', *Cornea*, 32(5), pp. 608-614.
13. Arnalich-Montiel, F., Lumbreras-Fernández, B., Martín-Navarro, C. M., Valladares, B., Lopez-Velez, R., Morcillo-Laiz, R. and Lorenzo-Morales, J. (2014) 'Influence of *Acanthamoeba* Genotype on Clinical Course and Outcomes for Patients with *Acanthamoeba Keratitis* in Spain', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), pp. 1213-1216.
14. Arvand, M. and Hack, A. (2013) 'Microbial contamination of dental unit waterlines in dental practices in Hesse, Germany: A cross-sectional study', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(1), pp. 49-52.
15. Arvanitidou, M., Spaia, S., Katsinas, C., Pangidis, P., Constantinidis, T., Katsouyannopoulos, V. and Vayonas, G. (1998) 'Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(4), pp. 949-54.
16. Asherson, R. A. and Cervera, R. (2003) 'Antiphospholipid antibodies and infections', *Annals of the Rheumatic diseases*, 62(5), pp. 388-93.
17. Assaidi, A., Ellouali, M., Latrache, H., Mabrouki, M., Timinouni, M., Zahir, H., Tankiouine, S., Barguigua, A. and Mliji, E. M. (2018) 'Adhesion of *Legionella pneumophila* on glass and plumbing materials commonly used in domestic water systems', *International Journal of Environmental Health Research*, 28(2), pp. 125-133.
18. Astorga, B., Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., Alarcón, V., Moreno, J., González, A. C., Navarrete, E., Piñero, J. E. and Valladares, B. (2011) '*Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(6), pp. 542-4.

19. Ausina, V., Catalán, V., Cercenado, E. and Pelaz Antolín, C. (2005) *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico Microbiológico y control de la Legionelosis*. SEIMC.
20. Azzopardi, M., Chong, Y. J., Ng, B., Recchioni, A., Logeswaran, A. and Ting, D. S. J. (2023) 'Diagnosis of Acanthamoeba Keratitis: Past, Present and Future', *Diagnostics (Basel)*, 13(16), pp. 2655.
21. Bagheri, H. R., Shafiei, R., Shafiei, F. and Sajjadi, S. A. (2010) 'Isolation of Acanthamoeba spp. from drinking waters in several Hospitals of Iran', *Iranian Journal of Parasitology*, 5(2), pp. 19-25.
22. Barker, J., Scaife, H. and Brown, M. R. (1995) 'Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of Legionella pneumophila', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(12), pp. 2684-8.
23. Bartram, J. (2007) *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. World Health Organization.
24. Bavari, S., Mirkalantari, S., Masjedani Jazi, F., Darban-Sarokhalil, D. and Golnari Marani, B. (2022) 'Risk assessment and quantitative measurement along with monitoring of Legionella in hospital water sources', *New Microbes and New Infections*, 45, pp. 100948.
25. Beck-Sague, C. M., Jarvis, W. R., Bland, L. A., Arduino, M. J., Agüero, S. M. and Verosic, G. (1990) 'Outbreak of gram-negative bacteremia and pyrogenic reactions in a hemodialysis center', *American Journal of Nephrology*, 10(5), pp. 397-403.
26. Behets, J., Declercq, P., Delaet, Y., Creemers, B. and Ollevier, F. (2007) 'Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples', *Journal Microbiology Methods*, 68(1), pp. 137-44.
27. Benito, J. R., Montejó, J. M., Cancelo, L., Zalacaín, R., López, L., Fernández Gil de Pareja, J., Alonso, E. and Oñate, J. (2003) 'Community-acquired pneumonia due to Legionella pneumophila serogroup 1. Study of 97 cases', *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 21(8), pp. 394-400.
28. Benson, R. F. and Fields, B. S. (1998) 'Classification of the genus Legionella', *Seminars in respiratory infections*, 13(2), pp. 90-9.
29. Berger, P., Papazian, L., Drancourt, M., La Scola, B., Auffray, J. P. and Raoult, D. (2006) 'Amoeba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia', *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), pp. 248-55.
30. Biglarnia, F., Solhjoo, K., Rezanezhad, H., Taghipour, A. and Armand, B. (2022) 'Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoeba in dialysis fluid samples of hydraulic systems in hemodialysis units', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (5), pp. 454-461.
31. Blair, N., Patil, P., Nguyen, D., Paudyal-Nepal, B. and Iorember, F. (2024) 'Antibiotic lock solutions as adjunct therapy for catheter-related blood stream infections in pediatric hemodialysis patients', *Frontiers Pediatric*, 12, pp. 1379895.
32. Blanquer Olivas, J., Borrás Salvador, R., Muñoz Gil, J., Chiner Vives, E., López Camps, V. and García Lomas, J. (1989) 'Legionellosis at intensive care units: study of 30 cases', *Revista Clínica Española*, 184(5), pp. 234-7.
33. Blyth, C. C., Adams, D. N. and Chen, S. C. (2009) 'Diagnostic and typing methods for investigating Legionella infection', *NSW Public Health Bulletin*, 20(9-10), pp. 157-61.
34. Boldur, I., Modai, D., Iainé, A., Boner, G. and Sompolinsky, D. (1982) 'Legionnaires' disease in Israel: a serological study of hemodialysis patients', *Israel Journal of Medical Sciences*, 18(6), pp. 667-70.
35. Boost, M., Cho, P., Lai, S. and Sun, W.-M. (2008) 'Detection of Acanthamoeba in Tap Water and Contact Lens Cases Using Polymerase Chain Reaction', *Optometry and Vision Science*, 85(7), pp. 526-530.
36. Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. and Messi, P. (2005) 'Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives', *Biotechnology Annual Review*, 11, pp. 355-80.
37. Borella, P., Montagna, M. T., Romano-Spica, V., Stampi, S., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tato, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., De Luca, G., Ossi, C., Moro, M. and D'Alcalá, G. R. (2004) 'Legionella infection risk from domestic hot water', *Emerging Infectious Diseases*, 10(3), pp. 457-464.
38. Bornstein, N., Mercatello, A., Marmet, D., Surgot, M., Deveaux, Y. and Fleurette, J. (1989) 'Pleural infection caused by Legionella anisa', *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), pp. 2100-2101.
39. Bowers, B. and Korn, E. D. (1969) 'The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment', *Journal of Cell Biology*, 41(3), pp. 786-805.
40. Bozue, J. A. and Johnson, W. (1996) 'Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion', *Infection and Immunity*, 64(2), pp. 668-73.
41. Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Epple, P., Bibb, W. F., McKinney, R. M., Starnes, R. W., Colville, J. M., Selander, R. K., Edelstein, P. H. and Moss, C. W. (1988) 'Legionella pneumophila serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of L. pneumophila subsp. pneumophila subsp. nov., L. pneumophila subsp. fraseri subsp. nov., and L. pneumophila subsp. pascullei subsp. nov.', *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), pp. 1695-703.

42. Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. and McDade, J. E. (1979) 'Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova', *Annals of Internal Medicine*, 90(4), pp. 656-8.
43. Bretscher, A. (1991) 'Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton', *Annual Review of Cell Biology*, 7, pp. 337-74.
44. Brindley, N., Matin, A. and Khan, N. A. (2009) 'Acanthamoeba castellanii: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations', *Experimental Parasitology*, 121(3), pp. 254-6.
45. Bruggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., Coppee, J.-Y. and Buchrieser, C. (2006) 'Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*', *Cellular microbiology*, 8(8), pp. 1228-1240.
46. Butt, C. G. (1966) 'Primary amebic meningoencephalitis', *The New England journal of medicine*, 274(26), pp. 1473-6.
47. Byrne, B. and Swanson, M. S. (1998) 'Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions', *Infection and Immunity*, 66(7), pp. 3029-34.
48. Bédard, E., Fey, S., Charron, D., Lalancette, C., Cantin, P., Dolcé, P., Laferrière, C., Déziel, E. and Prévost, M. (2015) 'Temperature diagnostic to identify high risk areas and optimize *Legionella pneumophila* surveillance in hot water distribution systems', *Water Research*, 71, pp. 244-56.
49. Cabello-Vílchez, A. M., Dávila-Barclay, A. and Tsukayama, P. (2022) 'Isolation and Genomic Analysis of an Intracellular *Mycobacterium gordonae* from a Free-Living *Acanthamoeba* sp. in a Hospital Environment in Lima, Peru', *Microbiology resource announcements*, 11(11), pp. e0078422.
50. Campocasso, A., Boughalmi, M., Fournous, G., Raoult, D. and La Scola, B. (2012) '*Legionella tunisiensis* sp. nov. and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from environmental water samples', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), pp. 3003- 3006.
51. Canal de Isabel-II (2023). El ciclo integral del agua - Tratamiento-ETAP. Disponible en: <https://www.canaldeisabelsegunda.es/es/tratamiento> [Consultado el 2-5-2023].
52. Canaud, B., Lucena, R. and Ward, R. (2023) 'Water and dialysis fluid purity for contemporary hemodialysis', *Seminars in Dialysis*, pp. 1-13.
53. Cano Portero, R., Martín Mesonero, C. and Amillategui Dos Santos, R. (2021) 'Vigilancia Epidemiológica De La Legionelosis En España, Años 2019 Y 2020. Informe De La Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica', *Boletín Epidemiológico Semanal*, 29(7), pp. 78-84.
54. Carlesso, A. M., Artuso, G. L., Caumo, K. and Rott, M. B. (2010) 'Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil', *Current Microbiology*, 60(3), pp. 185-190.
55. Casemore, D. P. (1977) 'Free-living amoebae in home dialysis unit', *Lancet*, 2(8047), pp. 1078.
56. Casini, B., Buzzigoli, A., Cristina, M. L., Spagnolo, A. M., Del Giudice, P., Brusaferrero, S., Poscia, A., Moscato, U., Valentini, P., Baggiani, A. and Privitera, G. (2014) 'Long-term effects of hospital water network disinfection on *Legionella* and other waterborne bacteria in an Italian university hospital', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(3), pp. 293-9.
57. Castellani, A. (1930) 'An amoeba found in culture of yeast: preliminary note', *Journal of Tropical Medicine*, 33, pp. 160.
58. Castrillón, J. C. and Orozco, L. P. (2013) '*Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas', *Revista chilena de infectología*, 30, pp. 147-155.
59. Catalan, V., García, F., Moreno, C., Vila, M. J. and Apraiz, D. (1997) 'Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction', *Research in Microbiology*, 148(1), pp. 71-8.
60. CDC (2019). Free Living Amebic Infections. Disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html> [Consultado el 5-4-2023].
61. CDC (2020). Dialysis Safety. Disponible en <https://www.cdc.gov/dialysis/index.html> [Consultado el 6-8-2023].
62. CDC (2021). *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever). Disponible en <https://www.cdc.gov/Legionella/index.html> [Consultado el 5-4-2023].
63. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) 'Notes from the field: primary amebic meningoencephalitis associated with ritual nasal rinsing--St. Thomas, U.S. Virgin islands, 2012', *Morbidity and mortality weekly report*, 62(45), pp. 903.
64. Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A. and Araujo, R. M. (2015) 'Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on Free *Legionella* and Amoebae-Associated *Legionella*', *PLoS ONE*, 10(8), pp. e0134726.

65. Chao-Pellicer, J., Arberas-Jiménez, I., Fuchs, F., Sifaoui, I., Piñero, J. E., Lorenzo-Morales, J. and Scheid, P. (2023) 'Repurposing of Nitroxoline as an Alternative Primary Amoebic Meningoencephalitis Treatment', *Antibiotics*, 12(8), pp. 1280.
66. Chatfield, C. H. and Cianciotto, N. P. (2007) 'The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity', *Infection and Immunity*, 75(8), pp. 4062-70.
67. Chiboub, O., Capote-Yanes, E., Sifaoui, I., Reyes-Battle, M., Rodríguez - Expósito, R. L., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2021) 'In vitro validation of the amoebicidal activity of commercial eye drops as second activity', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 15, pp. 144-151.
68. Chowdhury, M., Prakash, P. R., Singh, A., Jorwal, P., Das, S. and Soneja, M. (2023) 'Acanthamoeba meningoencephalitis causing secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in an immunocompetent patient: A first case report', *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 53(1), pp. 23-26.
69. Cianciotto, N. P. and Fields, B. S. (1992) 'Legionella-pneumophila-mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), pp. 5188-5191.
70. Cilloniz, C., Ewig, S., Gabarrus, A., Ferrer, M., Puig de la Bella Casa, J., Mensa, J. and Torres, A. (2017) 'Seasonality of pathogens causing community-acquired pneumonia', *Respirology*, 22(4), pp. 778-785.
71. Cillóniz, C., Miguel-Escuder, L., Pedro-Bonet, M. L., Falcó, V., Lopez, Y., García-Vidal, C., Gabarrús, A., Moreno, A., Torres, A. and Miró, J. M. (2018) 'Community-Acquired Legionella Pneumonia in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adult Patients: A Matched Case- Control Study', *Clinical infectious diseases*, 67(6), pp. 958-961.
72. Cipolla, L., Rocca, F., Armitano, R., López, B. and Prieto, M. (2023) 'Legionnaires' disease in Argentina: Evolution of the laboratory diagnostic strategy', *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), pp. 160-166.
73. Cirillo, J. D., Falkow, S. and Tompkins, L. S. (1994) 'Growth of *Legionella-pneumophila* in *Acanthamoeba-castellanii* Enhances Invasion', *Infection and Immunity*, 62(8), pp. 3254-3261.
74. Cloud, J. L., Carroll, K. C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D. R. (2000) 'Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation', *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), pp. 1709-12.
75. Compain, F., Bruneval, P., Jarraud, S., Perrot, S., Aubert, S., Napoly, V., Ramahefasolo, A., Mainardi, J. L. and Podglajen, I. (2015) 'Chronic endocarditis due to *Legionella anisa*: a first case difficult to diagnose', *New Microbes New Infections*, pp. 113-5.
76. Cope, J., Roy, S. and Ali, I. (2018) '865. Acanthamoeba Disease Associated With the Practice of Nasal Rinsing in Immunocompromised Patients', *Open Forum Infectious Diseases*, 5(Suppl 1), S22.
77. Cordes, L. G. and Fraser, D. W. (1980) 'Legionellosis: Legionnaires' disease; Pontiac fever', *Medical Clinics of North America*, 64(3), pp. 395-416.
78. Coronel, D., Armesto, A., Cigarrán, S. and Calviño, J. (2016) 'Legionella pneumophila: A Renal Vasculitis Trigger?', *Therapeutic apheresis and dialysis*, 20(6), pp. 686-687.
79. Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Gonçalves, J., Antunes, D. M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D. A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M. J., Gonçalves, P. and Gomes, J. P. (2016) 'Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease', *New England Journal of Medicine*, 374(5), pp. 497- 498.
80. Corsaro, D. (2020) 'Update on Acanthamoeba phylogeny', *Parasitology Research*, 119(10), pp. 3327-3338.
81. Corsaro, D., Pages, G. S., Catalan, V., Loret, J. F. and Greub, G. (2010) 'Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants', *International journal of hygiene and environmental health*, 213(3), pp. 158-66.
82. Cortés-Sánchez, A. de J., Espinosa-Chaurand, L. D. and Díaz-Ramírez, M. (2018) 'Legionella spp., a Hazard to human health', *Agro Productividad*, 11(11).
83. Coulliette, A. D. and Arduino, M. J. (2013) 'Hemodialysis and water quality', *Seminars in Dialysis*, 26(4), pp. 427-38.
84. Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G. and Thomas, V. (2010) 'Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), pp. 2689-97.
85. Courboules, C., Dournon, N., Lawrence, C., Noussair, L., Descours, G., Sivadon-Tardy, V., Jarraud, S., Herrmann, J. L., Gaillard, J. L., Espinasse, F., El Sayed, F. and Roux, A. L. (2022) 'Non-Legionella pneumophila serogroup 1 pneumonia: Diagnosis of a nosocomial legionellosis with the Biofire Pneumonia plus panel', *IDCases*, 28, pp. e01487.
86. Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, H. K. and Minner, J. R. (1959) 'Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba', *American journal of pathology*, 35(1), pp. 185-97.
87. Culbertson, C. G., Smith, J. W. and Minner, J. R. (1958) 'Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity', *Science*, 127(3313), pp. 1506.

88. Cunha, B. A., Burillo, A. and Bouza, E. (2016) 'Legionnaires' disease', *Lancet*, 387(10016), pp. 376-385.
89. Cursons, R. T., Brown, T. J., Keys, E. A., Moriarty, K. M. and Till, D. (1980) 'Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody', *Infection and Immunity*, 29(2), pp. 401-7.
90. D'Alessandro, D., Fabiani, M., Cerquetani, F. and Orsi, G. B. (2015) 'Trend of Legionella colonization in hospital water supply', *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita*, 27(2), pp. 460-6.
91. Da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B. and Marciano-Cabral, F. (2009) 'Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae', *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, pp. 1-14.
92. Damasiewicz, M. J., Polkinghorne, K. R. and Kerr, P. G. (2012) 'Water quality in conventional and home haemodialysis', *Nature reviews. Nephrology*, 8(12), pp. 725-34.
93. Davis, D., Thadhani, J., Choudhary, V., Nausheem, R., Vallejo-Zambrano, C. R., Mohammad Arifuddin, B., Ali, M., Carson, B. J., Kanwal, F. and Nagarajan, L. (2023) 'Advancements in the Management of Severe Community-Acquired Pneumonia: A Comprehensive Narrative Review', *Cureus*, 15(10), pp. e46893.
94. De Giglio, O., D'Ambrosio, M., Spagnuolo, V., Diella, G., Fasano, F., Leone, C. M., Lopuzzo, M., Trallo, V., Calia, C., Oliva, M., Pazzani, C., Iacumin, L., Barigelli, S., Petricciuolo, M., Federici, E., Lisena, F. P., Minicucci, A. M. and Montagna, M. T. (2023) 'Legionella anisa or Legionella bozemanii? Traditional and molecular techniques as support in the environmental surveillance of a hospital water network', *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(4), pp. 496.
95. De Lacerda, A. G. and Lira, M. (2021) 'Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology', *Ophthalmic and Physiological Optics*, 41(1), pp. 116-135.
96. Debnath, A. (2021) 'Drug discovery for primary amebic meningoencephalitis: from screen to identification of leads', *Expert review of anti-infective therapy*, 19(9), pp. 1099-1106.
97. Decker, B. K. and Palmore, T. N. (2014) 'Hospital water and opportunities for infection prevention', *Current infectious disease reports*, 16(10), pp. 432.
98. Deiana, G., Arghittu, A., Dettori, M., Masia, M., Deriu, M., Piana, A., Muroli, M. R., Castiglia, P. and Azara, A. (2021) 'Environmental Surveillance of Legionella spp. in an Italian University Hospital Results of 10 Years of Analysis', *Water*, 13.
99. Dendana, F., Sellami, H., Jarraya, F., Sellami, A., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Hachicha, J. and Ayadi, A. (2008) 'Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of Acanthamoeba genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia', *Parasite*, 15(2), pp. 137-42.
100. Devos, L., Clymans, K., Boon, N. and Verstraete, W. (2005) 'Evaluation of nested PCR assays for the detection of Legionella pneumophila in a wide range of aquatic samples', *Journal of applied microbiology*, 99(4), pp. 916-25.
101. Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'Amelio, S., D'Orazi, C. and Berrilli, F. (2009) 'Acanthamoeba T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy', *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(6), pp. 607-12.
102. Diehl, M. L. N., Paes, J. and Rott, M. B. (2021) 'Genotype distribution of Acanthamoeba in keratitis: a systematic review', *Parasitology Research*, 120(9), pp. 3051-3063.
103. Ditommaso, S., Biasin, C., Giacomuzzi, M., Zotti, C. M., Arione, R., Guglielmi, E., Barbaro, S., Di Leo, A., Serra, R., Marchiaro, G. and Ruggenini Moiraghi, A. (2006) 'Colonization of a water system by Legionella organisms and nosocomial legionellosis: a 5-year report from a large Italian hospital', *Infection control and hospital epidemiology*, 5, pp. 532-5.
104. Dominguez, R. and Holmes, K. C. (2011) 'Actin structure and function', *Annual review of biophysics*, 40, pp. 169-86.
105. Dos Santos Gomes, T. (2017) *Interacción entre Acanthamoeba y Legionella en el medio ambiente: implicación en salud humana. Tesis Doctoral. Universidad San Pablo CEU.*
106. Douglas, M. (1930) 'Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus', *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(258), pp. 59.
107. Drozanski, W. (1956) 'Fatal bacterial infection in soil amoebae', *Acta microbiologica Polonica* (1952), 5(3-4), pp. 315-7.
108. Dubois, J., Dubois, M. and Martel, J. F. (2020) 'In Vitro and Intracellular Activities of Omadacycline against Legionella pneumophila', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(5).
109. Duggal, S., Rongpharpi, S., Duggal, A., Kumar, A. and Biswal, I. (2017) 'Role of Acanthamoeba in granulomatous encephalitis: a review', *Journal of Infectious Diseases and Immune Therapies*, 1(1), pp. 2.
110. Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.-H., Sylvie, S. and Hechard, Y. (2013) 'Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants', *International journal of hygiene and environmental health*, 217.

111. Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S. and Molmeret, M. (2008) 'A PCR-based method for monitoring Legionella pneumophila in water samples detects viable but noncultivable Legionellae that can recover their cultivability', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), pp. 4817-24.
112. ECDC (2022) Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2020, Stockholm. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2020>
113. ECDC (2023) Legionnaires' disease. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease> [Consultado el 2-8-2023].
114. Edens, C., Wong, J., Lyman, M., Rizzo, K., Nguyen, D., Blain, M., Horwich-Scholefield, S., Moulton-Meissner, H., Epton, E., Rosenberg, J. and Patel, P. R. (2017) 'Hemodialyzer Reuse and Gram-Negative Bloodstream Infections', *American Journal of Kidney Diseases*, 69(6), pp. 726-733.
115. Eisenreich, W. and Heuner, K. (2016) 'The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila', *FEBS letters*, 590(21), pp. 3868-86.
116. El-Ebiary, M., Sarmiento, X., Torres, A., Nogué, S., Mesalles, E., Bodí, M. and Almirall, J. (1997) 'Prognostic factors of severe Legionella pneumonia requiring admission to ICU', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(5), pp. 1467-72.
117. Erat, T., Özdemir, H., Yahşi, A., Kara, T. T., Ince, E., Memikoğlu, K. O., Çiftçi, E. and Ince, E. (2020) 'Nosocomial pneumonia caused by water-born Legionella pneumophila in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient for thalassemia major', *The Turkish Journal of Pediatrics*, 62(5), pp. 868-871.
118. Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L. and Buchrieser, C. (2013) 'From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of Legionella pneumophila infection in both hosts', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 376, pp. 1-34.
119. Ethier, C. R., Read, A. T. and Chan, D. W. (2006) 'Effects of latrunculin-B on outflow facility and trabecular meshwork structure in human eyes', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(5), pp. 1991-8.
120. España. Jefatura del Estado (2007). Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/l/2007/07/03/14>.
121. España. Jefatura del Estado (2018). Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/lo/2018/12/05/3/con>.
122. España. Ministerio de la Presidencia, (2003). Real Decreto-Ley 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/02/07/140/con>
123. España. Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, (2023). Real Decreto-Ley 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/01/10/3>
124. España. Ministerio de Sanidad y Consumo (1995). Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/1995/12/28/2210>.
125. European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (2002) 'Section IV.1 Water treatment system', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(suppl\_7), pp. 45-46.
126. Farzi, N., Abrehdari-Tafreshi, Z., Zarei, O. and Chamani-Tabriz, L. (2017) 'Detection of Legionella pneumophila in urine and serum specimens of neutropenic febrile patients with haematological malignancies', *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11(1), pp. 49-53.
127. Fields, B. S., Benson, R. F. and Besser, R. E. (2002) 'Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation', *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), pp. 506-26.
128. Fisman, D. N., Lim, S., Wellenius, G. A., Johnson, C., Britz, P., Gaskins, M., Maher, J., Mittleman, M. A., Spain, C. V., Haas, C. N. and Newbern, C. (2005) 'It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area', *The Journal of Infectious Diseases*, 192(12), pp. 2066-73.
129. Fowler, M. and Carter, R. F. (1965) 'Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp.: a preliminary report', *British medical journal*, 2(5464), pp. 740-2.
130. Fragou, K., Kokkinos, P., Gogos, C., Alamanos, Y. and Vantarakis, A. (2012) 'Prevalence of Legionella spp. in water systems of hospitals and hotels in South Western Greece', *International Journal of Environmental Health Research*, 22(4), pp. 340-54.
131. Fraser, D., Tsai, T., Orenstein, W., Parkin, W., Beecham, H., Sharrar, R., Harris, J., Mallison, G., Martin, S., McDade, J., Shepard, C. and Brachman, P. (1977) 'Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia', *The New England journal of medicine*, 297(22) pp. 1189-97.
132. Friedman, S., Spitalny, K., Barbaree, J., Faur, Y. and McKinney, R. (1987) 'Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower', *American Journal of Public Health*, 77(5), pp. 568- 72.

133. Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Seyedirashti, S., Bergeron, D. L. and Lindquist, T. D. (1993) 'Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses', *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), pp. 1122-6.
134. Fritsche, T. R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R. P., Schleifer, K. H. and Gautom, R. K. (2000) 'Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp. 2613-9.
135. Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A. and Embley, T. M. (1991) 'The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae', *The Journal of General Microbiology*, 137(5), pp. 1215-22.
136. Fürnkranz, U. and Walochnik, J. (2021) 'Nosocomial Infections: Do Not Forget the Parasites', *Pathogens (Basel)*, 10(2), pp. 238.
137. Fürstner, A., Kirk, D., Michaël, D. B. F., Aïssa, C., De Souza, D., Müller, O. and Nicolaou, K. C. (2005) 'Diverted total synthesis: preparation of a focused library of latrunculin analogues and evaluation of their actin-binding properties', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), pp. 8103-8108.
138. Galarza, C., Ramos, W., Gutierrez, E. L., Ronceros, G., Teran, M., Uribe, M., Navincopa, M. and Ortega-Loayza, A. G. (2009) 'Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients', *International Journal of Dermatology*, 48(12), pp. 1324-9.
139. Galvan, A. L., Magnet, A., Izquierdo, F., Fenoy, S., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Henriques-Gil, N. and Del Aguila, C. (2013) 'Molecular Characterization of human-pathogenic Microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* isolated from various water sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), pp. 449-459.
140. Gao, L. Y. and Kwai, Y. A. (2000) 'The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba* polyphaga by *Legionella pneumophila*', *Environmental Microbiology*, 2(1), pp. 79-90.
141. Garcia, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M. T., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., Fillat, M. F., Peleato, M. L. and Clavel, A. (2013) 'Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques', *Environmental Science & Technology*, 47(7), pp. 3132-40.
142. Garcia-Vidal, C. and Carratalà, J. (2006) 'Current clinical management of Legionnaires' disease', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 4(6), pp. 995-1004.
143. García-Somoza, M. D., Fernández, A., Prats, E. and Verdaguer, R. (2010) 'Community-acquired pneumonia caused by *Legionella longbeachae* serogroup 1 in an immunocompetent patient', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, SEIMC 6, pp. 398-9.
144. Garner, J. S. (1996) 'Guideline for isolation precautions in hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17(1), pp. 53-80.
145. Garrity, G., Brown, A. and Vickers, R. (1980) 'Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, pp. 609-614.
146. Gaur, L., Chandola, I., Negi, N. and Rawat, P. (2023) 'Microbial profile and antibiotic resistance pattern of water supply in a tertiary care hospital of Uttarakhand', *Iranian Journal of Microbiology*, 15(2), pp. 225-235.
147. Gea-Izquierdo, E. (2018) 'Water disinfection methods and their affect on legionellosis'. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
148. Ghorbani, A., Hashemzadeh, M., Amin, M., Moosavian, M., Nashibi, R. and Mehraban, Z. (2021) 'Occurrence of the *Legionella* species in the respiratory samples of patients with pneumonia symptoms from Ahvaz, Iran; first detection of *Legionella cherokeei*', *Molecular Biology Reports*, 48(11), pp. 7141-7146.
149. GmbH, D. (2009) *Acanthamoeba* medium. DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany. Disponible en: <https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/>.
150. Goh, J. W. Y., Harrison, R., Hau, S., Alexander, C. L., Tole, D. M. and Avadhanam, V. S. (2018) 'Comparison of In Vivo Confocal Microscopy, PCR and Culture of Corneal Scrapes in the Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis', *Cornea*, 37(4), pp. 480-485.
151. Golestani, M. H., Rasti, S., Hooshyar, H., Delavari, M., Mousavi, S. G. A., Iranshahi, L. and Aghajani, A. (2018) 'Molecular Identification and Genotyping of *Acanthamoeba* Isolated from Environmental Sources in Kashan, Central Iran', *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(4).
152. Gomes T. S., Magnet, A., Izquierdo, F., Vaccaro, L., Redondo, F., Bueno, S., Sánchez, M. L., Angulo, S., Fenoy, S., Hurtado, C. and Del Aguila, C. (2016) '*Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain', *PLoS One*, 11(4), pp. e0154246.
153. Gomes, T. S., Gjiknuri, J., Magnet, A., Vaccaro, L., Ollero, D., Izquierdo, F., Fenoy, S., Hurtado, C. and Del Águila, C. (2018) 'The influence of *Acanthamoeba*-*Legionella* interaction in the virulence of two different *Legionella* species', *Frontiers in microbiology*, 9, pp. 2962.

154. Gomes, T. S., Vaccaro, L., Magnet, A., Izquierdo, F., Ollero, D., Martínez-Fernández, C., Mayo, L., Moran, M., Pozuelo, M. J., Fenoy, S., Hurtado, C. and del Águila, C. (2020) 'Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resistant bacteria in water from drinking water treatment plants', *The Science of the total environment*, 719, pp. 137080.
155. González-Robles, A., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V. I., Salazar-Villatoro, L., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Talamás-Rohana, P. and Martínez-Palomo, A. (2008) 'Acanthamoeba castellanii: Identification and distribution of actin cytoskeleton', *Experimental Parasitology*, 119(3), pp. 411-417.
156. Gordon, S. M., Tipple, M., Bland, L. A. and Jarvis, W. R. (1988) 'Pyrogenic reactions associated with the reuse of disposable hollow-fiber hemodialyzers', *JAMA*, 260(14), pp. 2077- 81.
157. Graells, T., Hernández-García, M., Pérez-Jové, J., Guy, L. and Padilla, E. (2018) 'Legionella pneumophila recurrently isolated in a Spanish hospital: Two years of antimicrobial resistance surveillance', *Environmental research*, 166, pp. 638–646.
158. Graham, F. F., Hales, S., White, P. S. and Baker, M. G. (2020) 'Review Global seroprevalence of legionellosis - a systematic review and meta-analysis', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 7337.
159. Greub, G. and Raoult, D. (2004) 'Microorganisms resistant to free-living amoebae', *Clinical microbiology reviews*, 17(2), pp. 413.
160. Grimstead, D., Tucker, D., Harris, K. and Turner, D. (2015) 'Cutaneous Legionella longbeachae Infection in Immunosuppressed Woman, United Kingdom', *Emerging Infectious Diseases*, 21(8), pp. 1426-8.
161. Grove, D. I., Lawson, P. J., Burgess, J. S., Moran, J. L., O'Fathartaigh, M. S. and Winslow, W. E. (2002) 'An outbreak of Legionella longbeachae infection in an intensive care unit?', *Journal of Hospital Infection*, 52(4), pp. 250-258.
162. Guan, Q., Alhuthali, B., Mfarrej, S., Halim, M. A., Almaghrabi, R. S. and Pain, A. (2022) 'Metagenomics-driven rapid diagnosis of an imported fatal case of rare amoebic meningoencephalitis', *Journal of Travel Medicine*, 4.
163. Gumbiner, B. M. (1996) 'Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis', *Cell*, 84(3), pp. 345-57.
164. Gültekin, F., Alagözlü, H., Candan, F., Nadir, I., Bakici, M. Z. and Sezer, H. (2005) 'The relationship between anticardiolipin antibodies and vascular access occlusion in patients on hemodialysis', *Asaio journal*, 51(2), pp. 162-4.
165. Hahn, H. J., Escrig, J. I., Shing, B. and Debnath, A. (2020) 'In Vitro Effect of Pitavastatin and Its Synergistic Activity with Isavuconazole against Acanthamoeba castellanii', *Pathogens (Basel)*, 9(9), pp. 681.
166. Halilu, F. and Hauptman, H. (2023) 'Rheumatoid Vasculitis Presenting with Incidental Renal Infarcts: Case Report and Literature Review', *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 2, pp. 28-33.
167. Hammer, B. K., Tateda, E. S. and Swanson, M. S. (2002) 'A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase Legionella pneumophila', *Molecular Microbiology*, 44(1), pp. 107-18.
168. Harun, A. and Beyza, E. (2019) 'Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital', *Japanese journal of infectious disease*, 72(5), pp. 318-322.
169. Hassan, A., Farouk, H., Hassanein, F., Abdul-Ghani, R. and Abdelhady, A. H. (2012) 'Acanthamoeba contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: a neglected potential source of infection', *Journal of Infection and Public Health*, 5(4), pp. 304- 10.
170. Haston, J. C. and Cope, J. R. (2023) 'Amebic encephalitis and meningoencephalitis: an update on epidemiology, diagnostic methods, and treatment', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 36(3), pp. 186-191.
171. Hayden, R. T., Uhl, J. R., Qian, X., Hopkins, M. K., Aubry, M. C., Limper, A. H., Lloyd, R. V. and Cockerill, F. R. (2001) 'Direct Detection of Legionella Species from Bronchoalveolar Lavage and Open Lung Biopsy Specimens: Comparison of LightCycler PCR, In Situ Hybridization, Direct Fluorescence Antigen Detection, and Culture', *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), pp. 2618-2626.
172. Heath, P. D., Booth, L., Leigh, P. N. and Turner, A. M. (1986) 'Legionella brain stem encephalopathy and peripheral neuropathy without preceding pneumonia', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 49(2), pp. 216-8.
173. Helbig, J. H., Engelstädter, T., Maiwald, M., Uldum, S. A., Witzleb, W. and Lück, P. C. (1999) 'Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18(10), pp. 716-22.
174. Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C. and Lück, P. C. (1997) 'Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups', *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), pp. 2841-5.
175. Helbig, J. H., Uldum, S. A., Bernander, S., Lück, P. C., Wewalka, G., Abraham, B., Gaia, V. and Harrison, T. G. (2003) 'Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp. 838-40.

176. Hendiger, E. B., Padzik, M., Sifaoui, I., Reyes-Battle, M., López-Arencibia, A., Rizo-Liendo, A., Bethencourt-Estrella, C. J., Nicolás-Hernández, D. S., Chiboub, O., Rodríguez-Expósito, R. L., Grodzik, M., Pietruczuk-Padzik, A., Stępień, K., Olędzka, G., Chomicz, L., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2020) 'Silver nanoparticles as a novel potential preventive agent against *Acanthamoeba keratitis*', *Pathogens*, 9(5).
177. Hendiger, E. B., Padzik, M., Sifaoui, I., Reyes-Battle, M., López-Arencibia, A., Zyskowska, D., Grodzik, M., Pietruczuk-Padzik, A., Hendiger, J., Olędzka, G., Chomicz, L., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2021) 'Silver Nanoparticles Conjugated with Contact Lens Solutions May Reduce the Risk of *Acanthamoeba Keratitis*', *Pathogens*, 10(5).
178. Hernández-Martínez, D., Reyes-Battle, M., Castelan-Ramírez, I., Hernández-Olmos, P., Vanzzini-Zago, V., Ramírez-Flores, E., Sifaoui, I., Piñero, J. E., Lorenzo-Morales, J. and Omaña-Molina, M. (2019) 'Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico', *Experimental Parasitology*, 197, pp. 29-35.
179. Herrera-Lara, S., Fernández-Fabrellas, E., Cervera-Juan, Á. and Blanquer-Olivas, R. (2013) 'Do seasonal changes and climate influence the etiology of community acquired pneumonia?', *Archivos de bronconeumologia*, 49(4), pp. 140-5.
180. Herwaldt, L. A., Gorman, G. W., McGrath, T., Toma, S., Brake, B., Hightower, A. W., Jones, J., Reingold, A. L., Boxer, P. A., Tang, P. W. and et al. (1984) 'A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant', *Annals of internal medicine*, 100(3), pp. 333-8.
181. Hicks, L. A., Rose, C. E., Jr., Fields, B. S., Drees, M. L., Engel, J. P., Jenkins, P. R., Rouse, B. S., Blythe, D., Khalifah, A. P., Feikin, D. R. and Whitney, C. G. (2007) 'Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis', *Epidemiology and Infection*, 135(5), pp. 811-7.
182. Hilbi, H., Hoffmann, C. and Harrison, C. F. (2011) '*Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence', *Environmental Microbiology Reports*, 3(3), pp. 286-96.
183. Hirakata, S., Sakiyama, Y., Yoshimura, A., Ikeda, M., Takahata, K., Tashiro, Y., Yoshimura, M., Arata, H., Yonezawa, H., Kirishima, M., Higashi, M., Hatanaka, M., Kanekura, T., Yagita, K., Matsuura, E. and Takashima, H. (2021) 'The application of shotgun metagenomics to the diagnosis of granulomatous amoebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris*: a case report', *BMC Neurology*, 21(1), pp. 392.
184. Hoenich, N. A. (2009) 'Disinfection of the hospital water supply: a hidden risk to dialysis patients', *Critical Care*, 13(6), pp. 1007.
185. Hoenich, N. A. and Levin, R. (2003) 'The implications of water quality in hemodialysis', *Seminars in Dialysis*, 16(6), pp. 492-7.
186. Hoffmann, R. and Michel, R. (2001) 'Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203(3), pp. 215-9.
187. Hookey, J., Saunders, N., Fry, N., Birtles, R. and Harrison, T. (1996) 'Phylogeny of Legionellaceae Based on Small-Subunit Ribosomal DNA Sequences and Proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-Like Amoebal Pathogens', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, pp. 526-531.
188. Hrubá, L. (2009) 'The colonization of hot water systems by *Legionella*', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(1), pp. 115-9.
189. Huang, S., Liang, X., Han, Y., Zhang, Y., Li, X. and Yang, Z. (2021) 'A pediatric case of primary amoebic meningo-encephalitis due to *Naegleria fowleri* diagnosed by next-generation sequencing of cerebrospinal fluid and blood samples', *BMC Infectious Diseases*, 21(1), pp. 1251.
190. Huang, Y., Ma, Y., Miao, Q., Pan, J., Hu, B., Gong, Y. and Lin, Y. (2019) 'Arthritis caused by *Legionella micdadei* and *Staphylococcus aureus*: metagenomic next-generation sequencing provides a rapid and accurate access to diagnosis and surveillance', *Annals of Translational Medicine*, 20, pp. 589.
191. Humphreys, H., O'Donovan, P. and Dwyer, S. (2022) 'Surveillance of hospital water systems to help predict the risk of nosocomial legionellosis-Consider other factors', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 43(8), pp. 1080-1081.
192. Hurt, M., Proy, V., Niederkorn, J. Y. and Alizadeh, H. (2003) 'The interaction of *Acanthamoeba castellanii* cysts with macrophages and neutrophils', *Journal Parasitology*, 89(3), pp. 565-72.
193. Im, K. and Kim, D. S. (1998) '*Acanthamoebiasis* in Korea: two new cases with clinical cases review', *Yonsei Medical Journal*, 39(5), pp. 478-84.
194. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (1990), 'PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications', *Biochemical Education*.
195. International Organization for Standardization, (2024) 'ISO 23500-3:2024: "Preparación y gestión de calidad de fluidos para hemodiálisis y terapias afines. Parte 3: Agua para hemodiálisis y terapias relacionadas" '.

196. Ishikawa, K., Nakamura, T., Matsuo, T., Kawai, F., Murakami, H., Aoki, K., Nagasawa, T., Uehara, Y. and Mori, N. (2022) 'Clinical Presentation of Legionella pneumophila Serogroup 1- Associated Pneumonia and Diffuse Alveolar Hemorrhage: A Case Report and Literature Review', *American Journal of Case Reports*, 23, pp. e936309.
197. Jager, B. V. and Stamm, W. P. (1972) 'Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin's disease', *Lancet*, 2(7791), pp. 1343-5.
198. Javanmard, E., Niyayati, M., Lorenzo-Morales, J., Lasjerdi, Z., Behniafar, H. and Mirjalali, H. (2017) 'Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran', *Experimental Parasitology*, 183, pp. 240-244.
199. Jeong, H. J. and Yu, H. S. (2005) 'The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea', *Korean Journal Parasitology*, 43(2), pp. 47-50.
200. Jha, B. K., Jung, H. J., Seo, I., Kim, H. A., Suh, S. I., Suh, M. H. and Baek, W. K. (2014) 'Chloroquine has a cytotoxic effect on *Acanthamoeba* encystation through modulation of autophagy', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), pp. 6235-41.
201. Joly, J. R., McKinney, R. M., Tobin, J. O., Bibb, W. F., Watkins, I. D. and Ramsay, D. (1986) 'Development of a standardized subgrouping scheme for Legionella pneumophila serogroup 1 using monoclonal antibodies', *Journal of Clinical Microbiology*, 23(4), pp. 768-71.
202. Jones, D. B., Visvesvara, G. S. and Robinson, N. M. (1975) '*Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis' *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 1992,95(2), pp. 221-32.
203. José Maschio, V., Corção, G. and Rott, M. B. (2015) 'Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(1), pp. 81-3.
204. Kahraman, M. and Akin Polat, Z. (2024) 'Are Thermotolerant and Osmotolerant Characteristics of *Acanthamoeba* Species an Indicator of Pathogenicity?', *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 48(1), pp. 15-20.
205. Kalra, S. K., Sharma, P., Shyam, K., Tejan, N. and Ghoshal, U. (2020) '*Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis', *Experimental parasitology*, 208, pp. 107788.
206. Kanamori, H., Weber, D. J., Flythe, J. E. and Rutala, W. A. (2022) 'Waterborne Outbreaks in Hemodialysis Patients and Infection Prevention', *Open Forum Infectious Diseases*9(3), pp. ofac058.
207. Kanamori, H., Weber, D. J. and Rutala, W. A. (2016) 'Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies', *Clinical Infectious Diseases*, 62(11), pp. 1423-1435.
208. Kangussu-Marcolino, M. M., Ehrenkauf, G. M., Chen, E., Debnath, A. and Singh, U. (2019) 'Identification of plicamycin, TG02, panobinostat, lestaurtinib, and GDC-0084 as promising compounds for the treatment of central nervous system infections caused by the free-living amoebae *Naegleria*, *Acanthamoeba* and *Balamuthia*', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11, pp. 80-94.
209. Kao, P. M., Tung, M. C., Hsu, B. M., Tsai, H. L., She, C. Y., Shen, S. M. and Huang, W. C. (2013) 'Real-time PCR method for the detection and quantification of *Acanthamoeba* species in various types of water samples', *Parasitology Research*, 112(3), pp. 1131-6.
210. Karagiannis, I., Brandsema, P. and M, V. D. S. (2009) 'Warm, wet weather associated with increased Legionnaires' disease incidence in The Netherlands', *Epidemiology and Infection*, 137(2), pp. 181-7.
211. Katz, S. K., Hakki, A., Schwartz, A. B. and Katz, S. M. (1989) 'Lack of antibodies to Legionella pneumophila and Legionella micdadei in hemodialysis patients', *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 23(2), pp. 151-2.
212. Kaul, D. R., Lowe, L., Visvesvara, G. S., Farmen, S., Khaled, Y. A. and Yanik, G. A. (2008) '*Acanthamoeba* infection in a patient with chronic graft-versus-host disease occurring during treatment with voriconazole', *Transplant Infectious Disease*, 10(6), pp. 437-41.
213. Kessler, M. A., Osman, F., Marx, J., Jr., Pop-Vicas, A. and Safdar, N. (2021) 'Hospital-acquired Legionella pneumonia outbreak at an academic medical center: Lessons learned', *American Journal of Infection Control*, 49(8), pp. 1014-1020.
214. Khan, N. A. (2006) '*Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), pp. 564-95.
215. Khedri, M., Fallah, M., Saidijam, M., Matini, M., Bazzazi, N. and Maghsood, A. H. (2023) 'Genotyping of Environmental Isolates of *Acanthamoeba* in Hamadan, West of Iran', *Iran Journal Parasitology*, 18(1), pp. 1-9.
216. Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C. and Jarraud, S. (2016) 'Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella', *Infection, Genetics and Evolution*, 43, pp. 108-22.
217. Khurana, S., Biswal, M., Kaur, H., Malhotra, P., Arora, P., Megha, K., Taneja, N. and Sehgal, R. (2015) 'Free living amoebae in water sources of critical units in a tertiary care hospital in India', *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(3), pp. 343-8.

218. Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D. G. and Matheson, M. (2004) 'Acanthamoeba keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(1), pp. 165-9.
219. Kim, M.-J., Moon, E.-K., Jo, H.-J., Quan, F.-S. and Kong, H.-H. (2023) 'Identifying the function of genes involved in excreted vesicle formation in *Acanthamoeba castellanii* containing *Legionella pneumophila*', *Parasites and Vectors*, 16(1), pp. 215.
220. Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L. and Isberg, R. R. (1998) 'Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*', *Molecular Microbiology*, 27(2), pp. 323-36.
221. Kofman, A. and Guarner, J. (2022) 'Infections Caused by Free-Living Amoebae', *Journal of Clinical Microbiology*, 60(1), pp. e0022821.
222. Koide, M., Higa, F., Tateyama, M., Nakasone, I., Yamane, N. and Fujita, J. (2006) 'Detection of *Legionella* species in clinical samples: Comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits', *Infection*, 34(5), pp. 264-8.
223. Kong, H. H. (2009) 'Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*', *Korean Journal Parasitology*, 47, pp. S21-8.
224. Kool, J. L., Bergmire-Sweat, D., Butler, J. C., Brown, E. W., Peabody, D. J., Massi, D. S., Carpenter, J. C., Pruckler, J. M., Benson, R. F. and Fields, B. S. (1999) 'Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(12), pp. 798-805.
225. Kot, K., Łanocha-Arendarczyk, N. and Kosik-Bogacka, D. (2021) 'Immunopathogenicity of *Acanthamoeba* spp. in the Brain and Lungs', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3).
226. Kuchta, J. M., States, S. J., McNamara, A. M., Wadowsky, R. M. and Yee, R. B. (1983) 'Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water', *Applied and Environmental Microbiology*, 46(5), pp. 1134-9.
227. Kulkarni, P., Olson, N., Paulson, J., Pop, M., Maddox, C., Claye, E., Goldstein, R., Sharma, M., Gibbs, S., Mongodin, E. and Sapkota, A. (2018) 'Conventional wastewater treatment and reuse site practices modify bacterial community structure but do not eliminate some opportunistic pathogens in reclaimed water', *Science of the Total Environment*, 639, pp. 1126-1137.
228. Lackner, P., Beer, R., Broessner, G., Helbok, R., Pfausler, B., Brenneis, C., Auer, H., Walochnik, J. and Schmutzhard, E. (2010) 'Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient', *Neurocritical Care*, 12(1), pp. 91-4.
229. Laganà, P., Caruso, G., Piccione, D., Giofrè, M., Pino, R. and Delia, S. (2014) '*Legionella* spp., amoebae and non-fermenting Gram negative bacteria in an Italian university hospital water system', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(3), pp. 489-493.
230. Lanternier, F., Ader, F., Pilmis, B., Catherinot, E., Jarraud, S. and Lortholary, O. (2017) 'Legionnaire's Disease in Compromised Hosts', *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(1), pp. 123-135.
231. Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A. M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J. C. and Gachie, J. P. (2006) 'Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems', *American Journal of Infection Control*, 34(8), pp. 520-5.
232. Lasjerdi, Z., Niyiyati, M., Lorenzo-Morales, J., Haghghi, A. and Taghipour, N. (2015) 'Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran', *Acta Parasitology*, 60(3), pp. 417-22.
233. Lau, H. Y. and Ashbolt, N. J. (2009) 'The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water', *Journal of applied microbiology*, 107(2), pp. 368-378.
234. Laurie, M. T., White, C. V., Retallack, H., Wu, W., Moser, M. S., Sakanari, J. A., Ang, K., Wilson, C., Arkin, M. R. and DeRisi, J. L. (2018) 'Functional Assessment of 2,177 U.S. and International Drugs identifies the quinoline nitroxoline as a potent amoebicidal agent against the pathogen *Balamuthia mandrillaris*', *mBio*, 9(5).
235. Lederer, S. R. and Schiff, H. (2002) 'Ultrapure dialysis fluid lowers the cardiovascular morbidity in patients on maintenance hemodialysis by reducing continuous microinflammation', *Nephron*, 91(3), pp. 452-5.
236. Lee, J., Caplivski, D., Wu, M. and Huprikar, S. (2009) 'Pneumonia due to *Legionella feeleii*: case report and review of the literature', *Transplant Infectious Disease*, 11(4), pp. 337-40.
237. Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S. and Zanetti, F. (2005) '*Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems', *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), pp. 373-9.
238. Levy, I. and Rubin, L. G. (1998) '*Legionella* pneumonia in neonates: a literature review', *Journal of Perinatology*, 18(4), pp. 287-90.
239. Li, Q., Yu, S., Yang, S., Yang, W., Que, S., Li, W., Qin, Y., Yu, W., Jiang, H. and Zhao, D. (2021) 'Eukaryotic community diversity and pathogenic eukaryotes in a full-scale drinking water treatment plant determined by 18S rRNA and metagenomic sequencing', *Environmental Science and Pollution Research*, 28(14), pp. 17417-17430.

240. Li, W., Wang, Z., Qu, J., Zhang, Y. and Sun, X. (2019) 'Acanthamoeba keratitis related to contact lens use in a tertiary hospital in China', *BMC Ophthalmology*, 19(1), pp. 202.
241. Liu, J., Zhang, W., Wu, S., Zeng, T., Luo, F., Jiang, Q. and Yang, R. (2023) 'A clinical case report of Balamuthia granulomatous amoebic encephalitis in a non-immunocompromised patient and literature review', *BMC Infectious diseases*, 23(1), pp. 245.
242. Lo Presti, F., Riffard, S., Neyret, C., Célard, M., Vandenesch, F. and Etienne, J. (1998) 'First isolation in Europe of Legionella feeleii from two cases of pneumonia', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 17(1), pp. 64-6.
243. Lombardi, A., Borriello, T., De Rosa, E., Di Duca, F., Sorrentino, M., Torre, I., Montuori, P., Trama, U. and Pennino, F. (2023) 'Environmental Monitoring of Legionella in Hospitals in the Campania Region: A 5-Year Study', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(8).
244. Lorenzo, V., López-Gómez, J. M., Pérez García, R. and Rodríguez Benítez, P. (2023). Calidad del líquido de diálisis y sus componentes: Agua y Concentrados, En Lorenzo V., López Gómez JM (Eds), *Nefrología al día*, Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/322>.
245. Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A. and Walochnik, J. (2015) 'An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment', *Parasite (Paris)*, 22, pp. 10.
246. Lorenzo-Morales, J., Lindo, J. F., Martínez, E., Calder, D., Figueroa, E., Valladares, B. and Ortega-Rivas, A. (2005a) 'Pathogenic Acanthamoeba strains from water sources in Jamaica, West Indies', *Annals Tropical Medicine Parasitology*, 99(8), pp. 751-8.
247. Lorenzo-Morales, J., López-Darias, M., Martínez-Carretero, E. and Valladares, B. (2007) 'Isolation of potentially pathogenic strains of Acanthamoeba in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco', *Experimental Parasitology*, 117(1), pp. 74-9.
248. Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J. E. and Valladares, B. (2013a) 'Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?', *Trends in Parasitology*, 29(4), pp. 181-187.
249. Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C. A., Jiménez, C., Tejedor, M. L., Valladares, B. and Ortega-Rivas, A. (2005b) 'Evaluation of Acanthamoeba isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12(2), pp. 233-236.
250. Lorenzo-Morales, J., Morcillo-Laiz, R., Martín-Navarro, C. M., López-Vélez, R., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Maciver, S. K., Valladares, B. and Martínez-Carretero, E. (2011) 'Acanthamoeba keratitis due to genotype T11 in a rigid gas permeable contact lens wearer in Spain', *Contact Lens and Anterior Eye*, 34(2), pp. 83-6.
251. Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E. and Valladares, B. (2005c) 'Isolation and identification of pathogenic Acanthamoeba strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources', *Parasitology Research*, 95(4), pp. 273-7.
252. Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Martínez, E., Khoubbane, M., Artigas, P., Periago, M. V., Foronda, P., Abreu-Acosta, N., Valladares, B. and Mas-Coma, S. (2006) 'Acanthamoeba isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt', *Acta Tropica*, 100(1), pp. 63-69.
253. Lorenzo-Morales, J., Valladares, M., Sancho, J., Reyes-Batlle, M., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., González, A. C., López-Medina, L., Piñero, J. E. and Martínez-Carretero, E. (2013b) 'First report of a case of prostatitis due to Acanthamoeba in a dog', *Acta Protozoologica*, 52(4).
254. Loret, J.-F. and Greub, G. (2010) 'Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3), pp. 167-75.
255. Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F. and Lévi, Y. (2005) 'Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and Legionella control', *Journal Water Health*, 3(4), pp. 423-33.
256. Lotonin, K., Bondarenko, N., Nasonova, E., Rayko, M. and Smirnov, A. (2022) 'Balamuthia spinosa sp. (Amoebozoa, Discosea) from the brackish-water sediments of Nivå Bay (Baltic Sea, The Sound) - a novel potential vector of Legionella pneumophila in the environment', *Parasitology Research*, 121, pp. 713-724.
257. Lowry, P. W., Blankenship, R. J., Gridley, W., Troup, N. J. and Tompkins, L. S. (1991) 'A cluster of Legionella sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water', *The New England Journal of Medicine*, 324(2), pp. 109-13.
258. Lu, J., Struwing, I., Vereen, E., Kirby, A. E., Levy, K., Moe, C. and Ashbolt, N. (2016) 'Molecular Detection of Legionella spp. and their associations with Mycobacterium spp., Pseudomonas aeruginosa and amoeba hosts in a drinking water distribution system', *Journal of applied microbiology*, 120(2), pp. 509-521.
259. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. (2002) 'Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), pp. 506-77.

260. Lück, P. C., Dinger, E., Helbig, J. H., Thurm, V., Keuchel, H., Presch, C. and Ott, M. (1994) 'Analysis of Legionella pneumophila strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(7), pp. 565-71.
261. Magnét, A., Galván, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Pérez- Irezábal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., da Silva, A. J. and del Aguila, C. (2012) 'Molecular characterization of Acanthamoeba isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates', *Parasitology Research* (1987), 111(1), pp. 383-392.
262. Magnét, A., Gomes, T. S., Pardinás, C., García de Blas, N., Sadaba, C., Carrillo, E., Izquierdo, F., Del Castillo, J. M. B., Hurtado, C., Del Aguila, C. and Fenoy, S. (2018) 'Can artificial tears prevent Acanthamoeba keratitis? An in vitro approach', *Parasitology and Vectors*, 11(1), pp. 50.
263. Magnét, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A. L., Izquierdo, F., Fenoy, S. and del Aguila, C. (2014) 'Novel Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate', *Parasitology Research* (1987), 113(8), pp. 2845-2850.
264. Magnét, A., Peralta, R. H. S., Gomes, T. S., Izquierdo, F., Fernandez-Vadillo, C., Galvan, A. L., Pozuelo, M. J., Pelaz, C., Fenoy, S. and Del Águila, C. (2015) 'Vectorial role of Acanthamoeba in Legionella propagation in water for human use', *The Science of the total environment*, 505, pp. 889-895.
265. Mahmoudi, M. R., Zebardast, N., Masangkay, F. R. and Karanis, P. (2021) 'Detection of potentially pathogenic free-living amoebae from the Caspian Sea and hospital ward dust of teaching hospitals in Guilan, Iran', *Journal Water Health*, 19(2), pp. 278-287.
266. Mangram, A. J., Horan, T. C., Pearson, M. L., Silver, L. C. and Jarvis, W. R. (1999) 'Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee', *American Journal of Infection Control*, 27(2), pp. 97-132.
267. Marchesi, I., Ferranti, G., Bargellini, A., Marchegiano, P., Predieri, G., Stout, J. E. and Borella, P. (2013) 'Monochloramine and chlorine dioxide for controlling Legionella pneumophila contamination: biocide levels and disinfection by-product formation in hospital water networks', *Journal Water Health*, 11(4), pp. 738-47.
268. Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003) 'Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), pp. 273-307.
269. Marciano-Cabral, F. and Toney, D. M. (1998) 'The interaction of Acanthamoeba spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines', *Journal Eukaryot Microbiology*, 45(4), pp. 452-8.
270. Marcó, J., Martí Costa, S., Martín Zorraquino, J., Pastor Pérez, P. and Rodríguez Tarodo, J. (2023) *Ecología y biología de Legionella. Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones*, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
271. Marinelli, L., Cottarelli, A., Solimini, A. G., Del Cimmuto, A. and De Giusti, M. (2017) 'Evaluation of timing of re-appearance of VBNC Legionella for risk assessment in hospital water distribution systems', *Annali Di Igiene Medicina Preventiva E Di Comunita*, 29(5), pp. 431-439.
272. Martínez, A. J. and Visvesvara, G. S. (1997) 'Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas', *Brain pathology*, 7(1), pp. 583-598.
273. Mavridou, A., Smeti, E., Mandilara, G., Pappa, O., Plakadonaki, S., Grispou, E. and Polemis, M. (2008) 'Prevalence study of Legionella spp. contamination in Greek hospitals', *International Journal of Environmental Health Research*, 18(4), pp. 295-304.
274. McClelland, M. R., Vaszar, L. T. and Kagawa, F. T. (2004) 'Pneumonia and osteomyelitis due to Legionella long-beachae in a woman with systemic lupus erythematosus', *Clinical Infectious Diseases*, 38(10), pp. e102-6.
275. McGinnis, S., Free, R. J., Burnell, J., Basavaraju, S. V., Kanaskie, T., Hannapel, E. J., Pliat, N., Warren, K. and Edens, C. (2023) 'Suspected Legionella Transmission from a Single Donor to Two Lung Transplant Recipients - Pennsylvania, May 2022', *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72(37), pp. 1001-1004.
276. McKee, C. T., Wood, J. A., Shah, N. M., Fischer, M. E., Reilly, C. M., Murphy, C. J. and Russell, P. (2011) 'The effect of biophysical attributes of the ocular trabecular meshwork associated with glaucoma on the cell response to therapeutic agents', *Biomaterials*, 32(9), pp. 2417-2423.
277. Mercante, J. W. and Winchell, J. M. (2015) 'Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations', *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), pp. 95-133.
278. Minnaganti, V. R. and Cunha, B. A. (2001) 'Infections associated with uremia and dialysis', *Infectious Disease Clinics of North America*, 15(2), pp. 385-406.
279. Misra, D. P., Harris, L. F. and Shasteen, W. J. (1987) 'Legionella feeleeii pneumonia', *Southern Medical Journal* 80(8), pp. 1063-4.
280. Mohammady, A., Dalimi, A., Ghafarifar, F., Akbari, M. and Pirestani, M. (2023) 'Genotyping of Acanthamoeba Isolated from Hospital Environments and Thermal Water of Recreational Baths in Markazi Province, Iran', *Iran Journal Parasitology*, 18(1), pp. 38-47.

281. Mohan, N., Chakrabarti, A., Nazm, N., Mehta, R. and Edward, D. (2022) 'Newer advances in medical management of glaucoma', *Indian journal of ophthalmology*, 70(6), pp. 1920-1930.
282. Mojtahedi, S. Y., Rahbarimanesh, A., Noorbakhsh, S., Shokri, H., Jamali-Moghadam- Siyahkali, S. and Izadi, A. (2019) 'Urinary antigene and PCR can both be used to detect Legionella pneumophila in children's hospital-acquired pneumonia', *European Journal of Translational Myology*, 29(2), pp. 8120.
283. Monforte, R., Estruch, R., Vidal, J., Mensa, J., Marco, F., Cervera, R., Tarrero, I., Jiménez de Anta, M. T. and Urbano-Márquez, A. (1989) 'A community outbreak of Legionnaires' disease in Barcelona: clinical and microbiological study', *Medicina Clinica (Barc)*, 93(14), pp. 521-5.
284. Montanari, L. B., Sartori, F. G., Cardoso, M. J., Varo, S. D., Pires, R. H., Leite, C. Q., Prince, K. and Martins, C. H. (2009) 'Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(1), pp. 37-43.
285. Montoya, A., Miró, G., Saugar, J. M., Fernández, B., Checa, R., Gálvez, R., Bailo, B., Marino, V., Piñero, J. E., Lorenzo-Morales, J. and Fuentes, I. (2018) 'Detection and molecular characterization of Acanthamoeba spp. in stray cats from Madrid, Spain', *Experimental Parasitology*, 188, pp. 8-12.
286. Moreno-Mesonero, L., Soler, L., Amorós, I., Moreno, Y., Ferrús, M. A. and Alonso, J. L. (2023) 'Protozoan parasites and free-living amoebae contamination in organic leafy green vegetables and strawberries from Spain', *Food Water-borne Parasitology*, 32, pp. e00200.
287. Muchesa, P., Leifels, M., Jurzik, L., Hoorzook, K. B., T.G., B. and Bartie, C. (2016) 'Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems', *Parasitology research (1987)*, 116(1), pp. 155-165.
288. Muder, R. R. and Yu, V. L. (2002) 'Infection due to Legionella species other than L. pneumophila', *Clinical Infectious Diseases*, 35(8), pp. 990-998.
289. Mungroo, M. R., Khan, N. A., Maciver, S. and Siddiqui, R. (2022) 'Opportunistic free-living amoebal pathogens', *Pathogens and Global Health*, 116(2), pp. 70-84.
290. Murdoch, D. R. and Chambers, S. T. (2000) 'Detection of Legionella DNA in peripheral leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by Legionella dumoffii', *Clinical Infectious Diseases*, 30(2), pp. 382-3.
291. Murdoch, D. R., Light, G. J., Jennings, L. C. and Chambers, S. T. (1999) 'Sequence-based classification scheme for the genus Legionella targeting the 5S rRNA gene', *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1), pp. 281.
292. Murdoch, D. R., Podmore, R. G., Anderson, T. P., Barratt, K., Maze, M. J., French, K. E., Young, S. A., Chambers, S. T. and Werno, A. M. (2013) 'Impact of routine systematic polymerase chain reaction testing on case finding for Legionnaires' disease: a pre-post comparison study', *Clinical Infectious Diseases*, 57(9), pp. 1275-81.
293. Murdoch, D. R., Walford, E. J., Jennings, L. C., Light, G. J., Schousboe, M. I., Cheresky, A. Y., Chambers, S. T. and Town, G. I. (1996) 'Use of the polymerase chain reaction to detect Legionella DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia', *Clinical Infectious Diseases*, 23(3), pp. 475-80.
294. Murray, P. (2021) *Microbiología médica*. Elviesier.
295. Muyltermans, A., Descheemaeker, P., Boel, A., Desmet, S., Van Gasse, N., Reynders, M. and on behalf of the National Expert Committee on Infectious, S. (2020) 'What is the risk of missing legionellosis relying on urinary antigen testing solely? A retrospective Belgian multicenter study', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(4), pp. 729-734.
296. Nagel, J. L., Rarus, R. E., Crowley, A. W. and Alaniz, C. (2014) 'Retrospective analysis of azithromycin versus fluoroquinolones for the treatment of Legionella pneumonia', *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 39(3), pp. 203-5.
297. Naginton, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. and Steele, A. D. M. (1975) 'Amoebic Infection of the Eye', *Lancet*, 2, pp. 1537-40.
298. Nahapetian, K., Challemel, O., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P. and Squinazi, F. (1991) 'The intracellular multiplication of Legionella pneumophila in protozoa from hospital plumbing systems', *Research in Microbiology*, 142(6), pp. 677-85.
299. Nakamura, I., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Kobayashi, T., Sato, A., Watanabe, H. and Matsumoto, T. (2020) 'Persistent Legionella contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan', *International journal of infectious diseases*, 93, pp. 300-304.
300. Napoli, C., Fasano, F., Iatta, R., Barbuti, G., Cuna, T. and Montagna, M. T. (2010) 'Legionella spp. and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities', *BMC Public Health*, 10, pp. 660.
301. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (1988), Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

302. Nazarian, E. J., Bopp, D. J., Saylor, A., Limberger, R. J. and Musser, K. A. (2008) 'Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(2), pp. 125-32.
303. Nazemi, S., Mirzaii, M., Yaslianifard, S., Darban-Sarokhalil, D., Khoramrooz, S. S., Norozi, P. and Davardoost, F. (2016) 'Microbiological qualification of air, water and dialysate in a haemodialysis centre; a new focus on Legionella spp.', *Iranian journal of microbiology*, 8(4), pp. 219–225.
304. Newton, H. J., Ang, D. K., van Driel, I. R. and Hartland, E. L. (2010) 'Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila', *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), pp. 274-98.
305. Nisar, M. A., Ros, K., Brown, M., Bentham, R., Best, O., Xi, J., Hinds, J. and Whiley, H. (2023) 'Stagnation arising through intermittent usage is associated with increased viable but non culturable Legionella and amoeba hosts in a hospital water system', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13.
306. Nisar, M. A., Ross, K. E., Brown, M. H., Bentham, R. and Whiley, H. (2020) 'Legionella pneumophila and Protozoan Hosts: Implications for the Control of Hospital and Potable Water Systems', *Pathogens (Basel)*, 9(4), pp. 286.
307. Nishida, T., Nakagawa, N., Watanabe, K., Shimizu, T. and Watarai, M. (2019), 'Attenuated Legionella pneumophila Survives for a Long Period in an Environmental Water Site', *BioMed research international*, 2019, pp. 8601346.
308. Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Mohebbali, M., Rezaie, S., Rahimi, F., Babaei, Z., Martín- Navarro, C., Farnia, S. and Valladares, B. (1970) 'Comparison of a PCR-Based Method with Culture and Direct Examination for Diagnosis of Acanthamoeba keratitis', *Iranian Journal of Parasitology*, 4(2).
309. Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaie, S., Rahimi, F., Martín-Navarro, C. M., Mohebbali, M., Maghsood, A. H., Farnia, S., Valladares, B. and Rezaeian, M. (2010) 'First report of a mixed infection due to Acanthamoeba genotype T3 and Vahlkampfia in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran', *Experimental parasitology*, 126(1), pp. 89-90.
310. Niyyati, M., Saberi, R., Lorenzo-Morales, J. and Salehi, R. (2016) 'High occurrence of potentially-pathogenic free-living amoebae in tap water and recreational water sources in South-West Iran', *Tropical biomedicine*, 33(1), pp. 95–101.
311. Norouzi, M., Saberi, R., Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Mirjalali, H., Fatemi, M., Javanmard, E. and Karamati, S. A. (2021) 'Molecular Identification of Pathogenic Free-Living Amoeba from Household Biofilm Samples in Iran: A Risk Factor for Acanthamoeba Keratitis', *Microorganisms*, 9(10).
312. Official Journal of the European Union (2020) Directiva- (EU)-2020/2184, (16 December 2020) on the quality of water intended for human consumption. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj>.
313. Okka, M., Tian, B. and Kaufman, P. (2004) 'Effect of Low-Dose Latrunculin B on Anterior Segment Physiologic Features in the Monkey Eye', *Archives of ophthalmology*, 122(10), pp. 1482–1488.
314. Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Iliana Salazar-Villatoro, L., Lorenzo-Morales, J., Cristóbal-Ramos, A. R., Hernández-Ramírez, V. I., Talamás-Rohana, P., Méndez Cruz, A. R. and Martínez-Palomo, A. (2012) 'Reevaluating the Role of Acanthamoeba Proteases in Tissue Invasion: Observation of Cytopathogenic Mechanisms on MDCK Cell Monolayers and Hamster Corneal Cells', *BioMed research international*, (2013), pp. 461329.
315. Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L. I., Cristóbal-Ramos, A. R., González-Lázaro, M., Salinas-Moreno, E., Méndez-Cruz, R., Sánchez-Cornejo, M., De la Torre-González, E. and Martínez-Palomo, A. (2010) 'Acanthamoeba castellanii: Morphological analysis of the interaction with human cornea', *Experimental Parasitology*, 126(1), pp. 73-78.
316. Omaña-Molina, M., Sanchez-Rocha, R., Hernandez-Martinez, D., Romero Grijalva, M., Salinas-Lara, C., Rodriguez-Sosa, M., Juarez-Avelar, I., Salazar-Villatoro, L., Gonzalez-Robles, A., Mendez-Cruz, A. R., Aley-Medina, P., Espinosa-Villanueva, J., Castelan-Ramirez, I. and Lorenzo-Morales, J. (2017) 'Type 2 diabetes mellitus BALB/c mice are more susceptible to granulomatous amoebic encephalitis: Immunohistochemical study', *Experimental Parasitology*, 183, pp. 150-159.
317. OMS, (2007) Legionella and the prevention of legionellosis, Geneva: World Health Organization
318. OMS, (2011) Guía de la calidad del agua potable. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/item/9789241549950>.
319. OMS, (2022) Legionellosis. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>.
320. Ongut, G., Yavuz, A., Ogunc, D., Tuncer, M., Ozturk, F., Mutlu, D., Donmez, L., Colak, D., Ersoy, F., Yakupoglu, G. and Gultekin, M. (2004) 'Seroprevalence of antibodies to Legionella pneumophila in hemodialysis patients', *Transplantation Proceedings*, 36(1), pp. 44-6.
321. Optenhövel, M., Mellmann, A. and Kuczius, T. (2023) 'Occurrence and prevalence of Legionella species in dental chair units in Germany with a focus on risk factors', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(10), pp. 1235-1244.
322. Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Zuñiga, L. D., Rodriguez-Anaya, L. Z., Lares-Jiménez, L. F., Gonzalez-Galaviz, J. R. and Lares-Villa, F. (2022) 'Distribution and Current State of Molecular Genetic Characterization in Pathogenic Free-Living Amoebae', *Pathogens*, 11(10).

323. Padrnos, L. J., Blair, J. E., Kusne, S., DiCaudo, D. J. and Mikhael, J. R. (2014) 'Cutaneous legionellosis: case report and review of the medical literature', *Transplant Infectious Disease*, 16(2), pp. 307-14.
324. Page, F. C. (1967) 'Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species', *The Journal of Protozoology*, 14(4), pp. 709-24.
325. Palutke, W. A., Crane, L. R., Wentworth, B. B., Geiger, J. G., Cardozo, L., Singhakowinta, A., Bartley, J. and Robinson, B. E. (1986) 'Legionella feeleii-associated pneumonia in humans', *American Journal of Clinical Pathology*, 86(3), pp. 348-51.
326. Panjwani, N., Zhao, Z., Baum, J., Hazlett, L. D. and Yang, Z. (1997) 'Acanthamoebae bind to rabbit corneal epithelium in vitro', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38(9), pp. 1858-64.
327. Papa, V., van der Meulen, I., Rottey, S., Sallet, G., Overweel, J., Asero, N., Minassian, D. C. and Dart, J. K. G. (2022) 'Safety and tolerability of topical polyhexamethylene biguanide: a randomised clinical trial in healthy adult volunteers', *British Journal of Ophthalmology*, 106(2), pp. 190-196.
328. Párraga-Niño, N., Cortès-Tarragó, R., Quero, S., Garcia-Núñez, M., Arqué, E., Sabaté, S., Ramirez, D. and Gavaldà, L. (2024) 'Persistence of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* state in hospital water systems: A hidden enemy?', *Science Total Environment*, 927, pp. 172410.
329. Patterson, W. J., Hay, J., Seal, D. V. and McLuckie, J. C. (1997) 'Colonization of transplant unit water supplies with *Legionella* and protozoa: precautions required to reduce the risk of legionellosis', *Journal of Hospital Infection*, 37(1), pp. 7-17.
330. Pearce, M. M., Theodoropoulos, N., Mandel, M. J., Brown, E., Reed, K. D. and Cianciotto, N. P. (2012) '*Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), pp. 2946-2954.
331. Perez Ortiz, A., Hahn, C., Schaible, T., Rafat, N. and Lange, B. (2021) 'Severe Pneumonia in Neonates Associated with *Legionella pneumophila*: Case Report and Review of the Literature', *Pathogens*, 10(8).
332. Pesanti, E. L. (2001) 'Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure', *Infectious Disease Clinics of North America*, 15(3), pp. 813-32.
333. Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., Lortholary, O., Zumla, A. and Abubakar, I. (2014) 'Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease', *Lancet Infectious Diseases*, 14(10), pp. 1011-21.
334. Pignato, S., Coniglio, M. A., Faro, G., Cantaro, P., Carini, S. A., Mangano, G., Cunsolo, R., Coco, G. and Giammanco, G. (2006) 'Legionella contamination in the hospital environment: monitoring of the hot water distribution systems of three hospitals in Catania (Italy)', *Ig Sanita Pubbl*, 62(6), pp. 635-52.
335. Pine, L., George, J. R., Reeves, M. W. and Harrell, W. K. (1979) 'Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*', *Journal of Clinical Microbiology*, 9(5), pp. 615-26.
336. Pinto, L. F., Andriolo, B. N. G., Hofling-Lima, A. L. and Freitas, D. (2021) 'The role of *Acanthamoeba* spp. in biofilm communities: a systematic review', *Parasitology research* (1987), 120(8), pp. 2717-2729.
337. Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003) 'Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments', *Cell*, 112(4), pp. 453-65.
338. Prussin, A. J., 2nd, Schwake, D. O. and Marr, L. C. (2017) 'Ten Questions Concerning the Aerosolization and Transmission of *Legionella* in the Built Environment', *Building and Environment*, 123, pp. 684-695.
339. Pumidonming, W., Walochnik, J., Dauber, E. and Petry, F. (2011) 'Binding to complement factors and activation of the alternative pathway by *Acanthamoeba*', *Immunobiology*, 216(1- 2), pp. 225-33.
340. Puschkarew, B. M. (1913) Über die Verbreitung der Süßwasser-Protozoen durch die Luft. Lippert.
341. Pussard, M. (1977) 'Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida)', *Protistologica*, 13, pp. 557-598.
342. Quero, S., Párraga-Niño, N., Garcia-Núñez, M., Pedro-Botet, M. L., Gavaldà, L., Mateu, L., Sabrià, M. and Mòdol, J. M. (2021) 'The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonised with *Legionella*', *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1916.
343. Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G. S., Sriram, R. and da Silva, A. J. (2006) 'Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*', *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp. 3589-3595.
344. Randag, A. C., de Kroon, L., Otten, H., Arias Claro-Handgraaf, C., Schimmer, B., Kortbeek, T., van Rooij, J. and Stelma, F. F. (2023) 'In Vitro Effectiveness of Soft Contact Lens Solutions Available on the Dutch Market against *Acanthamoeba* Species', *Pathogens*, 12(2).

345. Rasmussen, C. A., Kaufman, P. L., Ritch, R., Haque, R., Brazzell, R. K. and Vittitow, J. L. (2014) 'Latrunculin B Reduces Intraocular Pressure in Human Ocular Hypertension and Primary Open-Angle Glaucoma', *Translational vision science & technology*, 3(5), pp. 1.
346. Rayamajhee, B., Willcox, M. D. P., Henriquez, F. L., Petsoglou, C., Subedi, D. and Carnt, N. (2022) 'Acanthamoeba, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens', *Trends in Parasitology*, 38(11), pp. 975-990.
347. Retana Moreira, L., Vargas Ramírez, D., Linares, F., Prescilla Ledezma, A., Vaglio Garro, A., Osuna, A., Lorenzo Morales, J. and Abrahams Sandí, E. (2020) 'Isolation of Acanthamoeba T5 from Water: Characterization of Its Pathogenic Potential, Including the Production of Extracellular Vesicles', *Pathogens*, 9(2).
348. Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Cabello-Vílchez, A. M., Reyes-Batlle, M., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2014) 'Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba and Balamuthia mandrillaris from combination shower units in Costa Rica', *Parasitology Research*, 113(11), pp. 4117-4122.
349. Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Castro-Artavia, E., Fernández-Sánchez, A., Castro- Castillo, A., Reyes-Batlle, M. and Lorenzo-Morales, J. (2015) 'Isolation and Molecular Characterization of Acanthamoeba Strains from Dental Units in Costa Rica', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(6), pp. 733-6.
350. Reyes-Batlle, M., Díaz, F. J., Sifaoui, I., Rodríguez-Expósito, R., Rizo-Liendo, A., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2021 a) 'Free living amoebae isolation in irrigation waters and soils of an insular arid agroecosystem', *The Science of the total environment*, 753, pp. 141833.
351. Reyes-Batlle, M., Mura-Escorche, G., Sifaoui, I., Otero-Ruiz, A., Alfaro-Sifuentes, R., López- Arencibia, A., Rocha-Cabrera, P., Chiboub, O., Rizo-Liendo, A., Zamora-Herrera, J., Bethencourt-Estrella, C. J., Rodríguez-Expósito, R. L., Nicolás-Hernández, D. S., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2019) 'In vitro evaluation of combined commercialized ophthalmic solutions against Acanthamoeba strains', *Pathogens*, 8(3).
352. Reyes-Batlle, M., Rodríguez-Talavera, I., Sifaoui, I., Rodríguez-Expósito, R. L., Rocha- Cabrera, P., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2021 b) 'In vitro amoebicidal effects of arabinogalactan-based ophthalmic solution', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 16, pp. 9-16.
353. Richard, R. L., Ithoi, I., Abd Majid, M. A., Wan Sulaiman, W. Y., Tan, T. C., Nissapatorn, V. and Lim, Y. A. (2016) 'Monitoring of Waterborne Parasites in Two Drinking Water Treatment Plants: A Study in Sarawak, Malaysia', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(7).
354. Richards, A. M., Von Dwingelo, J. E., Price, C. T. and Abu Kwaiq, Y. (2013) 'Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction', *Virulence*, 4(4), pp. 307-14.
355. Rivera, M. A. and Padhya, T. A. (2002) 'Acanthamoeba: A Rare Primary Cause of Rhinosinusitis', *The Laryngoscope*, 112(7), pp. 1201-1203.
356. Rodríguez-Expósito, R. L., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Fuchs, F., Scheid, P. L., Piñero, J. E., Sutak, R. and Lorenzo-Morales, J. (2023) 'Induction of Programmed Cell Death in Acanthamoeba culbertsoni by the Repurposed Compound Nitroxoline', *Antioxidants*, 12(12), pp. 2081.
357. Rodríguez-Expósito, R. L., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Maciver, S. K., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2022) 'Statins Induce Actin Cytoskeleton Disassembly and an Apoptosis- Like Process in Acanthamoeba spp', *Antibiotics*, 11(2).
358. Rowbotham, T. J. (1980) 'Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae', *Journal of Clinical Pathology*, 33(12), pp. 1179-83.
359. Rowbotham, T. J. (1983) 'Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae', *Journal of Clinical Pathology*, 36(9), pp. 978-86.
360. Rowbotham, T. J. (1986) 'Current views on the relationships between amoebae, Legionellae and man', *Israel Medical Association Journal*, 22(9), pp. 678-89.
361. Ruiz, M. A., Villuendas, M. C., Milagro, A., Blasco, M. and Aisa, M. L. (2000) 'Pneumonia caused by Legionella longbeachae serogroup 1', *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 18(8), pp. 423-4.
362. Rusinol, M., Hundesa, A., Cardenas-Youngs, Y., Fernandez-Bravo, A., Perez-Cataluna, A., Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Calvo, M., Luis Alonso, J., Jose Figueras, M., Araujo, R., Bofill-Mas, S. and Girones, R. (2020) 'Microbiological contamination of conventional and reclaimed irrigation water: Evaluation and management measures', *Science of the Total Environment*, 710, pp. 136298.
363. Rutala, W. A. and Weber, D. J. (1997) 'Water as a reservoir of nosocomial pathogens', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18(9), pp. 609-16.
364. Saberi, R., Fakhari, M., Sedighi, O., Espahbodi, F., Latifi, A., Makhloogh, A., Sharifpour, A., Ziaei Hezarjaribi, H. and Asfaram, S. (2019) 'First Molecular Evidences of Acanthamoeba T3, T4 and T5 Genotypes in Hemodialysis Units in Iran', *Acta Parasitology*, 64(4), pp. 911-915.

365. Saberi, R., Nakhaei, M., Fakhar, M., Zarrinfar, H., Sharifpour, A. and Hezarjaribi, H. Z. (2022) 'Molecular identification and genotyping of *Acanthamoeba* spp., in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompetent patients with chronic respiratory disorders (CRD)', *Parasitology Research*, 121(10), pp. 3013-3017.
366. Sabrià, M., García-Nuñez, M., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N., Gimeno, J. M., Reynaga, E., Morera, J. and Rey-Joly, C. (2001) 'Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(11), pp. 673-6.
367. Sakhæe, F., Mafi, S., Zargar, M., Vaziri, F., Hajiesmaeili, M., Siadat, S. D. and Fateh, A. (2022) 'Correlation between *Legionella pneumophila* serogroups isolated from patients with ventilator-associated pneumonia and water resources: a study of four hospitals in Tehran, Iran', *Environmental Science and Pollution Research*, 29(27), pp. 41368-41374.
368. Sambrook, J. and Green, M. (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
369. Samson, A. and Maze, M. (2024) 'Complications of atypical pneumonia: A case of *Legionella longbeachae* empyema', *Respirology case reports*, 12, pp. e01281.
370. Sayan, M., Kiliç, O., Yüce, A., Uçan, E. S. and Genç, S. (2003) 'Seropositivity against atypical pneumonia agents demonstrated in patients with community-acquired pneumonia', *Mikrobiyoloji Bülteni*, 37(4), pp. 247-53.
371. Schaumann, R., Pönisch, W., Helbig, J. H., Hegenbart, U., Ackermann, G., Hofmann, J., Niederwieser, D. and Rodloff, A. C. (2001) 'Pericarditis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation caused by *Legionella pneumophila* (non-serogroup 1)', *Infection*, 29(1), pp. 51-3.
372. Schneeberger, P. M., Dorigo-Zetsma, J. W., van der Zee, A., van Bon, M. and van Opstal, J.L. (2004) 'Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(4), pp. 269-73.
373. Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (2001) 'Use of Subgenomic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge', *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), pp. 1903-1911.
374. Schwartz, T., Kohlen, W., Jansen, B. and Obst, U. (2003) 'Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms', *FEMS Microbiol Ecol*, 43(3), pp. 325-35.
375. Segal, G. and Shuman, H. A. (1999) '*Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages', *Infection and immunity*, 67(5), pp. 2117-2124.
376. Sehulster, L. and Chinn, R. Y. (2003) 'Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)', *MMWR Recommendations and Reports*, 52(Rr-10), pp. 1-42.
377. Serrano-Suárez, A., Dellundé, J., Salvadó, H., Cervero-Aragó, S., Méndez, J., Canals, O., Blanco, S., Arcas, A. and Araujo, R. (2013) 'Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems', *Environmental science and pollution research international*, 20(8), pp. 5534-5544.
378. Shamsuzzaman, S. M. and Hashiguchi, Y. (2002) 'Thoracic amebiasis', *Clinics in Chest Medicine*, 23(2), pp. 479-92.
379. Sharrar, R. and Parkin, W. (1976), 'Respiratory Infection -- Pennsylvania. Morbidity and Mortality Weekly Report', *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 46(3), pp. 49– 50.
380. Shimmura-Tomita, M., Takano, H., Kinoshita, N., Toyoda, F., Tanaka, Y., Takagi, R., Kobayashi, M. and Kakehashi, A. (2018) 'Risk factors and clinical signs of severe *Acanthamoeba keratitis*', *Clinical Ophthalmology*, 12, pp. 2567-2573.
381. Shing, B., Balen, M., Fenical, W. and Debnath, A. (2022) 'Development of a Machine Learning- Based Cysticidal Assay and Identification of an Amebicidal and Cysticidal Marine Microbial Metabolite against *Acanthamoeba*', *Microbiology spectrum*, 10(3), pp. e0007722.
382. Shing, B., Balen, M., McKerrow, J. H. and Debnath, A. (2021), '*Acanthamoeba Keratitis*: an update on amebicidal and cysticidal drug screening methodologies and potential treatment with azole drugs', *Expert review of anti-infective therapy*, 19(11), pp. 1427– 1441.
383. Shing, B., Singh, S., Podust, L. M., McKerrow, J. H. and Debnath, A. (2020) 'The Antifungal Drug Isavuconazole Is both Amebicidal and Cysticidal against *Acanthamoeba castellanii*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(5).
384. Siddiqui, R. and Ahmed Khan, N. (2012) 'Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*', *Parasites & Vectors*, 5(1), pp. 6.
385. Siegel, M. O., Fedorko, D. P., Drake, S. K., Calhoun, L. B. and Holland, S. M. (2010) '*Legionella feeleyi* serotype 2 pneumonia in a man with chronic lymphocytic leukemia: a challenging diagnosis', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), pp. 2294-7.
386. Sifaoui, I., Díaz-Rodríguez, P., Rodríguez-Expósito, R. L., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Villatoro, L. S., Castelan-Ramírez, I., Omaña-Molina, M., Oliva, A. and Piñero, J. E. (2022) 'Pitavastatin loaded nanoparticles: a suitable ophthalmic treatment for *Acanthamoeba Keratitis* inducing cell death and autophagy in *Acanthamoeba polyphaga*', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 180, pp. 11-22.

387. Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Wagner, C., Chiboub, O., De Agustino Rodríguez, J., Rocha-Cabrera, P., Valladares, B., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2017) 'Evaluation of the anti-Acanthamoeba activity of two commercial eye drops commonly used to lower eye pressure', *Experimental Parasitology*, 183, pp. 117-123.
388. Sifaoui, I., Rodríguez-Talavera, I., Reyes-Batlle, M., Rodríguez-Expósito, R. L., Rocha-Cabrera, P., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2020a) 'In vitro evaluation of commercial foam Belcils® on Acanthamoeba spp', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, pp. 136-143.
389. Sifaoui, I., Yanes, E. C., Reyes-batlle, M., Rodríguez-expósito, R. L., Piñero, J. E. and Lorenzo-morales, J. (2020b) 'Combined amoebicidal effect of atorvastatin and commercial eye drops against Acanthamoeba castellanii neff: In vitro assay based on mixture design', *Pathogens*, 9(3).
390. Sikora, A., Wójtowicz-Bobin, M., Koziol-Montewka, M., Magryś, A. and Gładysz, I. (2015) 'Prevalence of Legionella pneumophila in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22(2), pp. 195-201.
391. Singh, A., Acharya, M., Jose, N., Gandhi, A. and Sharma, S. (2019) '18S rDNA sequencing aided diagnosis of Acanthamoeba jacobsi keratitis -A case report', *Indian Journal Ophthalmology*, 11, pp. 1886-1888.
392. Society, A. T. and America, I. D. S. o. (2005) 'Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(4), pp. 388-416.
393. Sohn, H.-J., Kang, H., Seo, G.-E., Kim, J.-H., Jung, S.-Y. and Shin, H.-J. (2017) 'Efficient Liquid Media for Encystation of Pathogenic Free-Living Amoebae', *Korean journal of parasitology*, 55(3), pp. 233-238.
394. Soler-Majoral, J., Sánchez-Escuredo, A., Prat Aymerich, C., Sanchis Vidal, E., Marín-Tàpia, A., Prats Bardají, M. S., Pérez-Mir, M., Juega Mariño, F. J., Cañas Solé, L., and Lauzurica, R. (2016). 'Orange sputum in a kidney transplant patient with Legionella micdadei pneumonia' *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, 36(5), pp. 558-560.
395. Sons, J. W. (2015) 'Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria', in M.E. Trujillo, S.D., P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey, W.B. Whitman (ed.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1-17.
396. Sousa-Ramos, D., Reyes-Batlle, M., Bellini, N. K., Rodríguez-Expósito, R. L., Martín-Real, C., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2022) 'Pathogenic free-living amoebae from water sources in Cape Verde', *Parasitology Research*, 121(8), pp. 2399-2404.
397. Spagnolo, A. M., Orlando, P., Perdelli, F. and Cristina, M. L. (2016) 'Hospital water and prevention of waterborne infections', *Reviews in medical microbiology*, 27(1), pp. 25-32.
398. Stewart, P. S., Rayner, J., Roe, F. and Rees, W. M. (2001) 'Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates', *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), pp. 525-32.
399. Storey, M. V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N. J. and Stenström, T. A. (2004) 'The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(9), pp. 656-62.
400. Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez- Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A. and Byers, T. J. (1998) 'The Evolutionary History of the Genus Acanthamoeba and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types', *The Journal of eukaryotic microbiology*, 45(1), pp. 45-54.
401. Stout, J. E., Muder, R. R., Mietzner, S., Wagener, M. M., Perri, M. B., DeRoos, K., Goodrich, D., Arnold, W., Williamson, T., Ruark, O., Treadway, C., Eckstein, E. C., Marshall, D., Rafferty, M. E., Sarro, K., Page, J., Jenkins, R., Oda, G., Shimoda, K. J., Zervos, M. J., Bittner, M., Camhi, S. L., Panwalker, A. P., Donskey, C. J., Nguyen, M. H., Holodniy, M. and Yu, V. L. (2007) 'Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28(7), pp. 818-24.
402. Straus, W. L., Plouffe, J. F., File, T. M., Jr., Lipman, H. B., Hackman, B. H., Salstrom, S. J., Benson, R. F. and Breiman, R. F. (1996) 'Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group', *Arch Intern Med*, 156(15), pp. 1685-92.
403. Suzuki, M., Satoh, N., Nakamura, M., Horita, S., Seki, G. and Moriya, K. (2016) 'Bacteremia in hemodialysis patients', *World Journal Nephrology*, 5(6), pp. 489-496.
404. Svarrer, C. W., Lück, C., Elverdal, P. L. and Uldum, S. A. (2012) 'Immunochromatic kits Xpect Legionella and BinaxNOW Legionella for detection of Legionella pneumophila urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease', *Journal Medical Microbiology*, 61(2), pp. 213-217.
405. Svendsen, J. H., Jønsson, V. and Niebuhr, U. (1987) 'Combined pericarditis and pneumonia caused by Legionella infection', *British Heart Journal*, 58(6), pp. 663-4.
406. Svirí, S., Raveh, D., Boldur, I., Safadi, R., Libson, E. and Ben-Yehuda, A. (1997) 'Legionella feeleii pneumonia and pericarditis', *Journal Infection*, 34(3), pp. 277-9.

407. Szczepanek, A., Tyszko, P., Kalinowski, P., Chmielewski, J., Choina, P. and Nowak-Starz, G. (2023) 'Occurrence of Legionella sp. bacteria in hot water systems in hospitals and nursing homes in the Świętokrzyskie Province of south-eastern Poland', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 30(4), pp. 654-660.
408. Szentmáry, N., Daas, L., Shi, L., Laurik, K. L., Lepper, S., Milioti, G. and Seitz, B. (2019) 'Acanthamoeba keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment', *Journal of Current Ophthalmology*, 31(1), pp. 16-23.
409. Sütçü, M., Aktürk, H., Gülümser-Şişko, S., Acar, M., Erol, O. B., Somer, A., Bilgiç, B. and Salman, N. (2018) 'Granulomatous amoebic encephalitis caused by Acanthamoeba in an immunocompetent child', *The Turkish Journal of Pediatrics*, 60(3), pp. 340-343.
410. Tabatabaei, M., Hemati, Z., Moezzi, M. O. and Azimzadeh, N. (2016) 'Isolation and identification of Legionella spp. from different aquatic sources in south-west of Iran by molecular & culture methods', *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), pp. 215-223.
411. Tablan, O. C., Anderson, L. J., Arden, N. H., Breiman, R. F., Butler, J. C. and McNeil, M. M. (1994) 'Guideline for prevention of nosocomial pneumonia. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 15(9), pp. 587-627.
412. Tablan, O. C., Anderson, L. J., Besser, R., Bridges, C. and Hajjeh, R. (2004) 'Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee', *MMWR Recommendations and Report*, 53(Rr-3), pp. 1-36.
413. Taghipour, T., Rasti, S., Saba, M., Delavari, M., Moosavi, G. A., Hooshyar, H. and Eslamirad, Z. (2022) 'Molecular detection and genotype identification of Acanthamoeba species from bronchoalveolar lavage of patients with pulmonary symptoms suspected of cancer', *Journal of Parasitic Diseases*, 46(4), pp. 1028-1035.
414. Tanabe, M., Nakajima, H., Nakamura, A., Ito, T., Nakamura, M., Shimono, T., Wada, H., Shimpō, H., Nobori, T. and Ito, M. (2009) 'Mycotic aortic aneurysm associated with Legionella anisa', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), pp. 2340-3.
415. Tatlock, H. (1944) 'A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57(1), pp. 95-99.
416. Teixeira, L. H., Rocha, S., Pinto, R. M., Caseiro, M. M. and Costa, S. O. (2009) 'Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from Acanthamoeba and Naegleria genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil', *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13(6), pp. 395-7.
417. Tesaro, M., Bianchi, A., Consonni, M., Pregliasco, F. and Galli, M. G. (2010) 'Environmental surveillance of Legionella pneumophila in two Italian hospitals', *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 46(3), pp. 274-8.
418. Thacker, W. L., Wilkinson, H. W., Plikaytis, B. B., Steigerwalt, A. G., Mayberry, W. R., Moss, C. W. and Brenner, D. J. (1985) 'Second serogroup of Legionella feeleii strains isolated from humans', *Journal of clinical microbiology*, 22(1), pp. 1-4.
419. Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S. and Greub, G. (2006) 'Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 2428-2438.
420. Thomas, V., Loret, J. F., Jousset, M. and Greub, G. (2008) 'Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant', *Environmental Microbiology*, 10(10), pp. 2728-45.
421. Thomasy, S. M., Morgan, J. T., Wood, J. A., Murphy, C. J. and Russell, P. (2013) 'Substratum stiffness and latrunculin B modulate the gene expression of the mechanotransducers YAP and TAZ in human trabecular meshwork cells', *Experimental eye research*, 113, pp. 66-73.
422. Thomasy, S. M., Raghunathan, V. K., Miyagi, H., Evashenk, A. T., Sermenó, J. C., Tripp, G. K., Morgan, J. T. and Murphy, C. J. (2018) 'Latrunculin B and substratum stiffness regulate corneal fibroblast to myofibroblast transformation', *Experimental eye research*, 170, pp. 101-107.
423. Thomasy, S. M., Wood, J. A., Kass, P. H., Murphy, C. J. and Russell, P. (2012) 'Substratum stiffness and latrunculin B regulate matrix gene and protein expression in human trabecular meshwork cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(2), pp. 952-8.
424. Ting, D. S. J., Ho, C. S., Cairns, J., Elshah, A., Al-Aqaba, M., Boswell, T., Said, D. G. and Dua, H. S. (2021) '12-year analysis of incidence, microbiological profiles and in vitro antimicrobial susceptibility of infectious keratitis: the Nottingham Infectious Keratitis Study', *British Journal of Ophthalmology*, 105(3), pp. 328-333.
425. Todd, C. D., Reyes-Battle, M., Piñero, J. E., Martínez-Carretero, E., Valladares, B., Streete, D., Lorenzo-Morales, J. and Lindo, J. F. (2015) 'Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies', *Journal Water Health*, 13(3), pp. 909-19.
426. Tossa, P., Deloge-Abarkan, M., Zmirou-Navier, D., Hartemann, P. and Mathieu, L. (2006) 'Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies', *BMC Public Health*, 6, pp. 112.

427. Totaro, M., Valentini, P., Costa, A. L., Frendo, L., Cappello, A., Casini, B., Miccoli, M., Privitera, G. and Baggiani, A. (2017) 'Presence of Legionella spp. in Hot Water Networks of Different Italian Residential Buildings: A Three-Year Survey', *International Journal Environmental Research Public Health*, 14(11).
428. Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Siles, M. and Müller, N. (2004) 'The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria', *Parasitology research*, 92, pp. 405-13.
429. Vaccaro, L., Gomes, T. S., Izquierdo, F., Magnet, A., Llorens Berzosa, S., Ollero, D., Salso, S., Alhambra, A., Gómez, C., López Cano, M., Pelaz, C., Bellido Samaniego, B., del Aguila, C., Fenoy, S. and Hurtado-Marcos, C. (2021) 'Legionella feeleii: Ubiquitous Pathogen in the Environment and Causative Agent of Pneumonia', *Frontiers in microbiology*, 12.
430. Vaccaro, L., Izquierdo, F., Magnet, A., Hurtado, C., Salinas, M. A., Gomes, T. S., Angulo, S., Salso, S., Pelaez, J., Tejada, M. I., Alhambra, A., Gómez, C., Enríquez, A., Estirado, E., Fenoy, S. and Del Aguila, C. (2016) 'First case of legionnaire's disease caused by Legionella anisa in Spain and the limitations on the diagnosis of Legionella no-pneumophila infections', *PloS one*, 11(7), pp. e0159726.
431. Vaccaro Muñoz, L. (2017) *Epidemiología de Legionella feeleii como agente causal de neumonía y diseño de nuevos métodos de diagnóstico*. Tesis Doctoral. Universidad CEU San Pablo.
432. Valladares, M., Reyes-Batlle, M., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Dorta-Gorrín, A., Wagner, C., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., Valladares, B. and Lorenzo-Morales, J. (2015) 'Molecular characterization of Acanthamoeba strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain', *Archives of Microbiology*, 197(5), pp. 639-643.
433. Verani, J. R., Lorick, S. A., Yoder, J. S., Beach, M. J., Braden, C. R., Roberts, J. M., Conover, C. S., Chen, S., McConnell, K. A., Chang, D. C., Park, B. J., Jones, D. B., Visvesvara, G. S. and Roy, S. L. (2009) 'National outbreak of Acanthamoeba keratitis associated with use of a contact lens solution, United States', *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), pp. 1236-42.
434. Verykiou, S., Goodhead, C., Parry, G. and Meggitt, S. (2018) 'Legionella feeleii: an unusual organism associated with cutaneous infection in an immunocompromised patient', *Clinical and Experimental Dermatology*, 43(3), pp. 300-302.
435. Viasus, D., Gaia, V., Manzur-Barbur, C. and Carratalà, J. (2022) 'Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment', *Infectious Diseases and Therapy*, 11(3), pp. 973-986.
436. Vicente, D., Marimón, J. M., Lanzeta, I., Martín, T. and Cilla, G. (2019) 'Fatal Case of Nosocomial Legionella pneumophila Pneumonia, Spain, 2018', *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), pp. 2097-2099.
437. Visvesvara, G. S., Mirra, S. S., Brandt, F. H., Moss, D. M., Mathews, H. M. and Martínez, A. J. (1983) 'Isolation of two strains of Acanthamoeba castellanii from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles', *Journal of Clinical Microbiology*, 18(6), pp. 1405-12.
438. Visvesvara, G. S., Moura, H. and Schuster, F. L. (2007) 'Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea', *FEMS immunology and medical microbiology*, 50(1), pp. 1-26.
439. Vázquez-Ortega, F., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Piñero, J. E., Lagunes, I., Trigos, Á., Lorenzo-Morales, J., Díaz-Marrero, A. R. and Fernández, J. J. (2020) 'Photodynamic treatment induced membrane cell damage in Acanthamoeba castellanii Neff', *Dyes and Pigments*, 180.
440. Wagner, C., Reyes-Batlle, M., Ysea, M. A., Pérez, M. V., de Rondón, C. G., Paduani, A. J., Pérez, A. D., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., de Galindo, M. V., de Suárez, E. P., Martínez-Carretero, E., Valladares, B., Piñero, J. E. and Lorenzo-Morales, J. (2016) 'Genotyping of clinical isolates of Acanthamoeba genus in Venezuela', *Acta Parasitologica*, 61(4), pp. 796-801.
441. Walochnik, J., Scheikl, U. and Haller-Schober, E. M. (2015) 'Twenty years of Acanthamoeba diagnostics in Austria', *Journal Eukaryotic Microbiology*, 62(1), pp. 3-11.
442. Wang, C., Chuai, X. and Liang, M. (2019) 'Legionella feeleii: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response', *Medical Microbiology and Immunology*, 208(1), pp. 25-32.
443. Wang, C., Saito, M., Tanaka, T., Amako, K. and Yoshida, S. (2015) 'Comparative analysis of virulence traits between a Legionella feeleii strain implicated in Pontiac fever and a strain that caused Legionnaires' disease', *Microbial Pathogenesis*, 89, pp. 79-86.
444. Wang, S. A., Levine, R. B., Carson, L. A., Arduino, M. J., Killar, T., Grillo, F. G., Pearson, M. L. and Jarvis, W. R. (1999) 'An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports', *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(11), pp. 746-51.
445. Wang, Y., Jiang, L., Zhao, Y., Ju, X., Wang, L., Jin, L., Fine, R. D. and Li, M. (2023) 'Biological characteristics and pathogenicity of Acanthamoeba', *Frontiers in microbiology*, 14, pp. 1147077.
446. Ward, R. A. (2009) 'Worldwide guidelines for the preparation and quality management of dialysis fluid and their implementation', *Blood Purification*, 27 (Suppl 1), pp. 2-4.

447. Wellinghausen, N., Frost, C. and Marre, R. (2001) 'Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), pp. 3985-3993.
448. Wilhelmus, K. R., Jones, D. B., Matoba, A. Y., Hamill, M. B., Pflugfelder, S. C. and Weikert, M. P. (2008) 'Bilateral Acanthamoeba keratitis', *American Journal of Ophthalmology*, 145(2), pp. 193-197.
449. Wilson, D. A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S. M. and Procop, G. W. (2003) 'Detection of Legionella pneumophila by real-time PCR for the mip gene', *Journal of clinical microbiology*, 41(7), pp. 3327-30.
450. Wingender, J. and Flemming, H.-C. (2011) 'Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens', *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), pp. 417-423.
451. Wolcott, R. (2021) 'Biofilm and catheter-related bloodstream infections', *British journal of nursing*, 30(8), pp. s4-s9.
452. Wood, J. A., McKee, C. T., Thomasy, S. M., Fischer, M. E., Shah, N. M., Murphy, C. J. and Russell, P. (2011) 'Substratum compliance regulates human trabecular meshwork cell behaviors and response to latrunculin B', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(13), pp. 9298-303.
453. Wynter-Allison, Z., Morales, J. L., Calder, D., Radlein, K., Ortega-Rivas, A. and Lindo, J. F. (2005) 'Acanthamoeba infection as a cause of severe keratitis in a soft contact lens wearer in Jamaica', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(1), pp. 92-94.
454. Yagi, S., Schuster, F. L. and Visvesvara, G. S. (2008) 'Demonstration of Balamuthia and Acanthamoeba mitochondrial DNA in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction', *Parasitology Research*, 102, pp. 1109.
455. Yamamoto, N., Kubota, T., Tateyama, M., Koide, M., Nakasone, C., Tohyama, M., Shinzato, T., Higa, F., Kusano, N., Kawakami, K. and Saito, A. (2003) 'Isolation of Legionella anisa from multiple sites of a hospital water system: the eradication of Legionella contamination', *Journal of Infection and Chemotherapy*, 9(2), pp. 122-5.
456. Yaslianifard, S., Mobarez, A. M., Fatolahzadeh, B. and Feizabadi, M. M. (2012) 'Colonization of hospital water systems by Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter in ICU wards of Tehran hospitals', *Indian Journal pathology & microbiology*, 55(3), pp. 352-6.
457. Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Ancelle, T., Batellier, L., Dupouy-Camet, J. and Chaumeil, C. (2007) 'Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of Acanthamoeba isolates from ocular infections', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(3), pp. 221-4.
458. Yu, P.-Y., Lin, Y., Lin, W.-R., Shih, H.-Y., Chuang, Y.-C., Ben, R.-J., Huang, W.-K., Chen, Y.-S., Liu, Y.-C., Chang, F.-Y., Yen, M.-Y., Liu, C.-C., Ko, W.-C., Lin, H.-H. and Shi, Z.-Y. (2008) 'The high prevalence of Legionella pneumophila contamination in hospital potable water systems in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia', *International journal of infectious diseases*, 12, pp. 416-20.
459. Zhang, Y., Xu, X., Wei, Z., Cao, K., Zhang, Z. and Liang, Q. (2023) 'The global epidemiology and clinical diagnosis of Acanthamoeba keratitis', *Journal of Infection and Public Health*, 16(6), pp. 841-852.
460. Zhou, Q., Huang, J., Guo, K., Lou, Y., Wang, H., Zhou, R., Tang, J. and Hou, P. (2023) 'Spatiotemporal distribution of opportunistic pathogens and microbial community in centralized rural drinking water: One year survey in China', *Environmental Research*, 218, pp. 115045.
461. Łanocha, N., Kosik-Bogacka, D. I., Maciejewska, A., Sawczuk, M., Wilk, A. and Kuźna-Grygiel, W. (2009) 'The Occurrence Acanthamoeba (Free Living Amoeba) in Environmental and Respiratory Samples in Poland', *Acta Protozoologica*, 48, pp. 271-279.

---

Carmen Martínez Fernández  
carmenmfdez116@gmail.com

**Título de la revisión:** Importancia clínico-epidemiológica de *Acanthamoeba* y *Legionella* en el ámbito hospitalario.

**Título de la Tesis:** Estudio de la importancia clínico-epidemiológica de *Acanthamoeba* y *Legionella* en el ámbito hospitalario.

**Directoras:** Soledad Fenoy Rodríguez y Ángela Magnet Dávila.

**Centro de realización:** Área de Parasitología. Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud. Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo.

**Centro de presentación:** Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo-CEU.

**Fecha de lectura:** 11 de septiembre de 2024.



*Ilustración:*  
Antonio Diu

**Cynthia Machin Pérez**

# LUCHA CONTRA LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN PEQUEÑOS RUMIANTES: DESAFÍOS Y MÉTODOS DE CONTROL

**1. ¿POR QUÉ LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES SON UN PROBLEMA MUNDIAL?**

**2. *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA* Y SU IMPACTO EN OVINOS**

2.1. CICLO BIOLÓGICO

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.3. PATOGENIA

2.4. CLÍNICA

**3. ¿CÓMO DISMINUIR LAS PÉRDIDAS PRODUCIDAS POR NGI?**

3.1. MANEJO DE PASTOS

3.2. CONTROL BIOLÓGICO

3.3. CONTROL MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN

3.4. SELECCIÓN GENÉTICA

3.5. VACUNAS

**4. BIBLIOGRAFÍA**

# 1 ¿POR QUÉ LOS NEMATODOS GASTROINTESTINALES SON UN PROBLEMA MUNDIAL?

Los nematodos gastrointestinales (NGI) generan graves pérdidas económicas (Figura 1) en el sector ganadero a nivel mundial al afectar a los rumiantes en pastoreo, principalmente de forma subclínica y crónica (Charlier y col., 2018; Skuce y col., 2013). En ovino, a modo de ejemplo, se estiman pérdidas productivas de hasta un 15% destinadas al mantenimiento de la inmunidad frente a estos parásitos (Charlier y col., 2018; Greer, 2008). Para mitigar estas pérdidas, en la Unión Europea se generan costes de hasta 400 millones de euros anuales en tratamientos (Matthews y col., 2016). Además, se espera que el impacto de las enfermedades por NGI sea aún mayor, vinculado a nuevos escenarios, que se interconectan entre sí, como el cambio climático, la creciente resistencia a antihelmínticos y la mayor demanda de productos de origen animal debido al crecimiento poblacional.



Figura 1. Pérdidas productivas causadas por los NGI.



Figura 2. Efecto del cambio climático en la distribución de los NGI.

En este sentido, el cambio climático parece afectar de forma directa a los parásitos y, por ende, a los parasitismos. Un ejemplo de ello es el aumento de temperatura que ha experimentado el planeta a lo largo de los años, que ha propiciado una redistribución de los NGI (Figura 1.2), extendiéndose cada vez más hacia los polos, desarrollándose especies tropicales en climas templados y prolongando su periodo de transmisión significativamente a lo largo de las estaciones (Fox y col., 2012; McMahon y col., 2012). Esto, que hasta hace unos años se consideraba una amenaza, ya es visible en diversos estudios de NGI, por ejemplo, en el Reino Unido, (van Dijk y col., 2010; McMahon y col., 2012; Sargison y col.,

2007) donde se puede apreciar el aumento de la prevalencia de *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* spp. y *Nematodirus battus*, coincidiendo con aumentos significativos de la temperatura media en los últimos años.

El calentamiento global también podría generar cambios en el patrón de crecimiento de la vegetación, influyendo en el estado físico por la falta de disponibilidad de nutrientes, pudiendo generar alteraciones en el sistema inmune, y en el manejo de los hospedadores debido a cambios en la temporalidad del pastoreo y a la densidad de animales de acuerdo con la vegetación disponible. Todo ello supondrá afrontar mayores riesgos en el futuro de la producción ganadera y podría contribuir a que los efectos de los NGI lleguen a ser incontrolables si se siguen utilizando las estrategias actuales de control (van Dijk y col., 2010).

El uso indebido de los antihelmínticos, que se han aplicado como tratamiento profiláctico a lo largo del tiempo, empeora aún más la situación. Hoy en día es muy común encontrar NGL multirresistentes a diferentes moléculas (Figura 3) presentes en el mercado en casi todo el mundo (Bordes y col., 2020; Dey y col., 2020; Herrera-Manzanilla y col., 2017; Martínez-Valladares, 2006; McIntyre y col., 2018) y debido a que la industria farmacéutica no es capaz de generar nuevas moléculas para el mercado con la suficiente celeridad, no es un modelo de control sostenible (McRae y col., 2015; Nari y col., 2003; Vercruysse y col., 2018). Además, una vez más, el cambio climático podría estar contribuyendo en la propagación de esta resistencia, al favorecer la supervivencia y el desarrollo larvario (Morgan y van Dijk, 2012; Rose y col., 2014, 2016).



Figura 3. Resistencia de los NGL a antihelmínticos.



Figura 4. Productos de origen animal.

Toda esta problemática, a su vez, se ve agravada por la mayor demanda de productos de origen animal (Figura 4) que existe en la actualidad, debida al incremento de la población mundial (Figura 5) y al crecimiento económico de países en vías de desarrollo, lo que supone otro reto para la ganadería (FAO, 2007; Steinfeld, 2006; Thornton, 2010). Se estima que los países en vías de desarrollo triplicaron su producción cárnica total entre 1980 y 2002, coincidiendo con el aumento de demanda que se produjo en ellos, además de la que ya existía en los países desarrollados (Thornton, 2010) y, es previsible que esta demanda y la de otros productos de origen animal sea mayor en futuros años (Banco Mundial, 2009).



Figura 5. Aumento poblacional y desarrollo económico

Debido a los problemas descritos anteriormente, se puede entender la imperiosa necesidad de incrementar los rendimientos productivos, que parece que lleva ineludiblemente a aumentar el número de animales para conseguir esa mayor producción (Figura 6). Sin embargo, esto se traduciría en un mayor deterioro del ecosistema. Así, se estima que, actualmente, el 18% de los gases invernadero de origen antropogénico pertenecen al sector ganadero (Smith y col., 2008; Steinfeld, 2006) y se ha observado que los parásitos son capaces de incrementar estas emisiones, por ejemplo, en torno a un 33% en corderos (Fox y col., 2018). Por otra parte, este sector ganadero ocupa en nuestros días el 30% de la superficie terrestre no cubierta de hielo (Thornton, 2010). Por tanto, un aumento indiscriminado en los censos de animales de producción repercutiría en el medioambiente, agravando la contaminación y afectando seriamente la disponibilidad de recursos naturales.

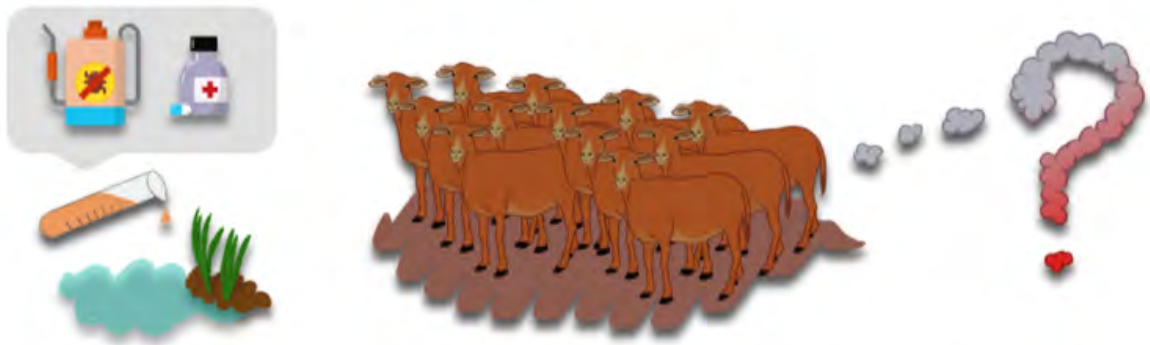


Figura 6. Soluciones no sostenibles para afrontar las pérdidas por NGI como: el uso indiscriminado de fármacos, el incremento del censo de animales y el uso de pesticidas para garantizar la alimentación de estos.

Estos motivos acentúan el interés en buscar alternativas al manejo clásico del ganado. Actualmente, para poder conseguir una producción eficiente y respetuosa con el medioambiente, se está estudiando la implementación de métodos de control sostenibles (Figura 7) y se apuesta de forma decidida por la detección temprana de enfermedades y de patógenos (Thornton, 2010). Algunos de estos métodos serán analizados a lo largo de la revisión bibliográfica, en especial, el uso de animales genéticamente resistentes y la inmunización frente a NGI. Es fundamental que apliquemos programas de control basados en métodos alternativos y complementarios a los fármacos frente a estos parásitos, para poder afrontar los cambios que se puedan producir en el planeta en el futuro (van Dijk y col., 2010).



Figura 7. Métodos sostenibles que se pueden adoptar para afrontar las pérdidas causadas por NGI como: el diagnóstico preventivo, la selección genética y el uso de vacunas, de forma que no sea necesario aumentar el censo de animales.



Figura 8. Resumen gráfico de problemas generados por nematodos gastrointestinales, situaciones agravantes y posibles soluciones.

## 2 TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA Y SU IMPACTO EN OVINOS

*Teladorsagia circumcincta* es uno de los nematodos gastrointestinales que más pérdidas económicas genera en ganado ovino y caprino (O'Connor y col., 2006; Stear y col., 2019). Esta especie pertenece a la superfamilia Trichostrongylidae, orden Strongylida (Bowman, 2011). Los estadios que desarrolla durante su ciclo presentan características morfológicas que permiten diferenciarlos de otros nematodos (Tabla 1).


Huevo	L3	Adulto	
			
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Medidas: 92-110 x 42-50 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>· Cáscara transparente, lisa y elipsoidal</li> <li>· Se depositan en fase de mórula</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Longitud: 795-865 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>· Longitud vaina: 30-44 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Color parduzco</li> <li>· Cavidad bucal corta y amplia</li> </ul>	
		<b>Hembra</b>	<b>Macho</b>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 10-12 mm</li> <li>· Vulva a mitad del cuerpo</li> <li>· Solapa vulvar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 7-9 mm</li> <li>· Bolsa copuladora con lóbulos laterales predominantes</li> <li>· Espículas cortas y gruesas (280-330 <math>\mu\text{m}</math>)</li> <li>· Gubernáculo 80-90 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul>

Tabla 1. Características morfológicas de los principales estadios de *Teladorsagia circumcincta*.

Fuentes: (Borchert, 1975; Meana y Rojo-Vázquez, 1999; Bowman, 2011; van Wyk y Mayhew, 2013).

### 2.1. CICLO BIOLÓGICO

Su ciclo de vida (Figura 9) es directo y comienza con la diseminación de huevos en fase de mórula (sin embrionar) en las heces del hospedador. De esta mórula eclosiona el primer estadio larvario (L1) que, más tarde, mudará al segundo (L2) (Bowman, 2011). Estos dos estadios de vida libre se alimentan de microorganismos fecales. Sin embargo, cuando se produce la segunda muda de L2 hacia la larva de tercer estadio o infectante (L3), la larva mantiene la cutícula del anterior estadio, lo que le impedirá seguir alimentándose del medio, pero a su vez, le servirá como vaina protectora (Bowman, 2011; O'Connor y col., 2006). El proceso del paso de huevo a estadio L3 se produce en 5-14 días si las condiciones climáticas son adecuadas (Martínez-Valladares, 2006). Una vez desarrollada la larva infectante, cuando hay suficiente humedad migra hacia la vegetación para favorecer su ingestión por parte del hospedador (Urquhart y col., 1996). No obstante, se ha observado que el estadio L3 puede llegar a sobrevivir largos periodos de tiempo en las heces si se mantiene en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad. Posiblemente, eso se debe a su vaina, que le aporta mayor resistencia a la desecación y al frío (van Dijk y col., 2010; O'Connor y col., 2006).

A continuación, ya dentro del animal, la larva libera su vaina cuando llega al rumen y se aloja en las glándulas abomasales de la región antropilórica para mudar al estadio L4 (Meana y Rojo-Vázquez, 1999). A los 6-10 días post-infección saldrá hacia el lumen y madurará al siguiente estadio (L5 o pre-adulto) (Martínez-Valladares, 2006). Por último, alcanzará la fase adulta y se apareará para dar lugar a los huevos (100-200 diarios), que serán eliminados posteriormente en las heces del hospedador, cerrando de este modo el ciclo (Meana y Rojo-Vázquez, 1999). Si este no se detiene, el periodo de prepatencia es de unos 17-21 días (Bowman, 2011; Meana y Rojo-Vázquez, 1999).

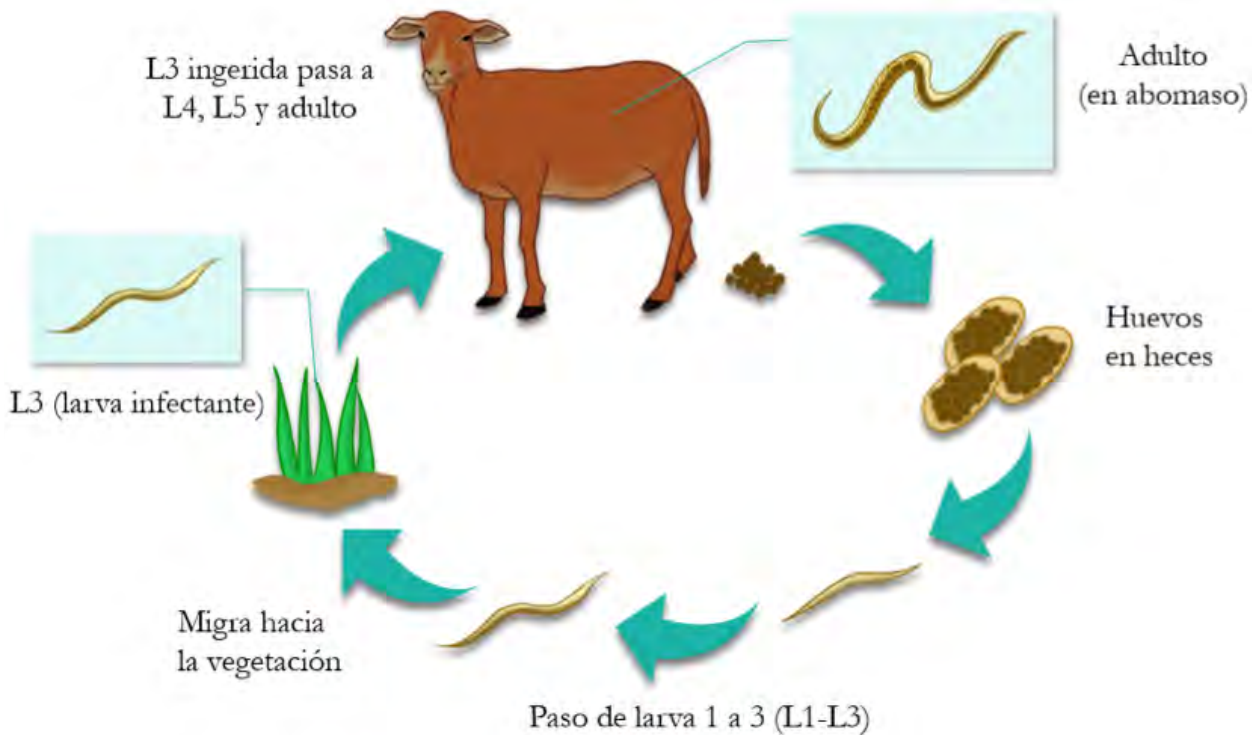


Figura 9. Representación del ciclo biológico de *Teladorsagia circumcincta*

El desarrollo del ciclo, y por tanto su prevalencia, va a depender de diferentes factores ambientales que condicionan la supervivencia y desarrollo larvario de los estadios de vida libre (Bowman, 2011; Morgan y van Dijk, 2012); del número de hospedadores infectados con parásitos adultos; de la resistencia que presenten estos al parásito; y del fenómeno denominado hipobiosis, que consiste en la detención temporal del desarrollo del estadio L4 hacia el L5 hasta que se produzca un estímulo concreto para su reactivación (Bowman, 2011; Urquhart y col., 1996). Se cree que esto último puede suceder como mecanismo de resistencia del hospedador o como resultado de la autorregulación generada por el propio parásito, bien porque las condiciones climáticas no son favorables en ese momento o porque la densidad de población del parásito es muy alta para que pueda ser tolerado por el animal (Martínez-Valladares, 2006; Soulsby, 1987).

## 2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Tanto la fase de desarrollo embrionario en el huevo, como la larvaria de *T. circumcincta*, sobreviven a temperaturas más bajas que las otras especies de nematodos del abomaso de ovinos como *H. contortus* (Waller y col., 2004). Los huevos sin embrionar poseen una mayor viabilidad entre 0 y 10°C, eclosionando una vez embrionados, a temperaturas menores a 5°C (O'Connor y col., 2006). El estadio pre-infectivo es algo más susceptible al frío, aunque cuando madura a larva infectante adquiere una mayor resistencia (O'Connor y col., 2006). Por otro lado, en general no toleran la desecación, aunque varía su susceptibilidad a lo largo de los estadios (O'Connor y col., 2006). Por esta razón se distribuyen por regiones húmedas y templadas como, por ejemplo, el norte de Europa, Asia, Norteamérica, Escandinavia y Nueva Zelanda - por encima de los 40° de latitud -, y zonas con clima Mediterráneo de todo el mundo - entre 30 y 40° latitud --. Aunque también se encuentran en regiones más cálidas como el sudeste de Australia (O'Connor y col., 2006) o, por ejemplo, en Gran Canaria, donde se ha observado en diferentes regiones de la isla independientemente de los microclimas de la isla (Hernández, 2015; Molina y col., 1997). Además, como consecuencia del calentamiento global, este parásito ha experimentado un aumento de su prevalencia en algunas zonas templadas, y ha extendido su ciclo hasta los meses de otoño (van Dijk y col., 2008, 2010; McMahan y col., 2012). Por otro lado, se ha observado que el calentamiento global puede a su vez disminuir la población de larvas infectantes que se encuentran latentes durante el invierno. Esto se debe a que, al aumentar la temperatura en esta estación, producen una aceleración del metabolismo de las larvas que, al contar con la vaina que les impide alimentarse del medio, agotan las reservas que poseen y mueren al no tener hospedadores susceptibles a los que infectar (van Dijk y col., 2010; O'Connor y col., 2006).

Debido al fenómeno de la hipobiosis, la enfermedad que produce *T. circumcincta* se puede presentar en dos épocas del año en las regiones templadas. Normalmente en esta zona los partos se producen en primavera, dando lugar a hembras más susceptibles a la infección y jóvenes que entran en contacto por primera vez con el parásito durante el pastoreo, lo cual ayuda a la diseminación de estos (Bowman, 2011; Urquhart y col., 1996). Por lo que, desde finales de primavera hasta verano (Abril-Junio) se contaminarán los pastos con L3, infectando a los animales especialmente entre Julio y Octubre, manifestando entonces los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, en ocasiones también se pueden manifestar durante el periodo comprendido entre finales de invierno y principios de primavera (Urquhart y col., 1996). Esto se atribuye a que se establecen las condiciones climáticas óptimas para que las larvas vuelvan a activar su metabolismo, tanto en el medio ambiente (L3), como las que se encuentran en hipobiosis (L4) dentro del hospedador -en especial en hembras en periodo de parto, debido a la supresión temporal de la inmunidad - (Bowman, 2011; van Dijk y col., 2010; Sargison y col., 2007) -. Por otro lado, en las regiones más cálidas como las subtropicales, los síntomas de la enfermedad se producen principalmente a finales de invierno, debido a la concentración de lluvias en esta estación (O'Connor y col., 2006; Urquhart y col., 1996).

“ Debido al fenómeno de la hipobiosis, la enfermedad que produce *T. circumcincta* se puede presentar en dos épocas del año en las regiones templadas. Normalmente en esta zona los partos se producen en primavera, dando lugar a hembras más susceptibles a la infección y jóvenes que entran en contacto por primera vez con el parásito durante el pastoreo, lo cual ayuda a la diseminación de estos ”

## 2.3. PATOGENIA

Durante la parasitación, las larvas penetran y crecen dentro de las glándulas del abomaso produciendo su dilatación, lo que conlleva a que las células parietales dañadas se sustituyan por células indiferenciadas (Martínez-Valladares, 2006; Meana y Rojo-Vázquez, 1999). A diferencia de las células parietales, las indiferenciadas no producen ácido clorhídrico, por lo que se va a ver disminuida su secreción, dando lugar a un aumento del pH en el abomaso, que va a tender a la neutralidad. Esta falta de ácido clorhídrico conlleva a un incremento de la población bacteriana, produciendo diarreas, al aumento de la producción de gastrina (favoreciendo el peristaltismo) y, además, a que se produzca una alteración en la digestión de proteínas (afecta al proceso de degradación del pepsinógeno en pepsina) (Bowman, 2011; Meana y Rojo-Vázquez, 1999; Soulsby, 1987; Urquhart y col., 1996).

## 2.4. CLÍNICA

Generalmente, la enfermedad cursa de forma subclínica y por ello, supone un problema importante en la producción ganadera, al reducir la producción láctea, calidad de la lana y la ganancia diaria de peso debido a la limitación de proteína disponible (Meana y Rojo-Vázquez, 1999). Cuando se producen signos clínicos, es más frecuente que en animales adultos se dé la forma crónica, manifestándose como emaciación debido a la pérdida de apetito, mientras que en jóvenes se produce la forma aguda, consistiendo principalmente en diarrea y consiguiente deshidratación (Martínez-Valladares, 2006; Meana y Rojo-Vázquez, 1999).

### 3 ¿CÓMO DISMINUIR LAS PÉRDIDAS PRODUCIDAS POR NGI?

Con el fin de reducir el impacto económico que han ejercido los NGI, la búsqueda de métodos de control se ha centrado en interrumpir el ciclo de vida del parásito. De esta manera, siempre se ha tratado de que cumplan alguno de los siguientes objetivos (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Kearney y col., 2016):

- Eliminar los nematodos en el hospedador.
- Disminuir el contacto entre el hospedador y las larvas infectantes de la vegetación.
- Aumentar la resistencia/resiliencia del hospedador.

Hasta ahora, el control más efectivo se realizaba a través de fármacos, pero desde que emergieron parásitos resistentes a ellos y comenzó la preocupación por el efecto de los químicos en nuestra alimentación y el medioambiente, se ha incrementado la búsqueda de nuevos métodos de control (Matthews y col., 2016). A continuación, se describirán tanto los métodos químicos, más convencionales, como otros métodos complementarios que se postulan como tendencias a adoptar en el futuro.

#### 3.1. CONTROL QUÍMICO

Los antihelmínticos (Figura 10) que podemos encontrar en el mercado se agrupan principalmente en 3 familias. La familia de los benzimidazoles (albendazol), la de los imidazotiazoles y las tetrahidropirimidinas (levamisol y pirantel), y la familia de las lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectina, entre otros) (Charlier y col., 2018; Coles y col., 2006). Aunque hay dos grupos de fármacos más recientes, uno es el de los derivados de amino-acetonitrilo (Amino-acetonitriles derivatives -AAD-), que se usa en algunos países y en el que se encuentran el monepantel, y el otro grupo son los espiroindoles como el derquantel, comercializado en combinación con abamactina (Charlier y col., 2018).



Figura 10. Antihelmínticos.

El tratamiento del ganado con antihelmínticos resultaba ser la solución más eficaz frente a nematodos, dependiendo de ellos desde la década de 1960 (Charlier y col., 2018). Este método era tan conveniente que, en respuesta al gran incremento de la demanda de productos de origen animal, se abusó de su empleo profiláctico con el fin de aumentar la producción (Vercruysse y col., 2018). Ese uso inadecuado y prolongado en el tiempo, eventualmente, dio lugar al desarrollo de resistencia por parte de los parásitos (Vercruysse y col., 2018), incluso, frente a una molécula tan reciente como el monepantel (Bartley y col., 2019; van den Brom y col., 2015), lo que indica que los vermes son capaces de adaptarse con rapidez (Kearney y col., 2016) y, actualmente, supone el principal obstáculo en el control de nematodos (Charlier y col., 2018; Kaplan y Vidyashankar, 2012). Además, el tratamiento químico acarrea otra serie de consecuencias, que se traducen en el depósito de residuos en la canal del ganado y su posible efecto en los consumidores y el medioambiente (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

A pesar de ello, los avances tecnológicos en biología molecular podrían contribuir al descubrimiento de nuevos fármacos orientados a proteínas específicas. Esto permitiría conocer cuáles son las mejores combinaciones de moléculas a realizar para ampliar el espectro de actuación del fármaco y, a la vez, ralentizar el desarrollo de resistencia a estos (Vercruysse y col., 2018). De hecho, actualmente se continúa el desarrollo de nuevos fármacos y se cree que en el futuro continuaremos dependiendo de ellos, si bien desde una perspectiva más sostenible. Por ejemplo, llevando a cabo tratamientos selectivos, estableciendo previamente planes de manejo, combinándolos con otros métodos y, probablemente, restringiendo el uso de ellos (Charlier y col., 2018; Vercruysse y col., 2018).

### Tratamiento Selectivo Dirigido y Tratamiento Dirigido:

El tratamiento dirigido (TT – *Targeted Treatment*) reduce el desarrollo de resistencia de los nematodos a los antihelmínticos al disminuir la frecuencia de tratamientos y la contaminación de pastos con larvas resistentes, tratando a todo el ganado en un momento determinado atendiendo a la parasitación media que presentan como grupo (Charlier y col., 2018; Kenyon y col., 2009). Por ejemplo, es conveniente realizarlo durante el periodo de parto, cuando existe un mayor riesgo de contagio (Charlier y col., 2014). No obstante, para aplicar correctamente este método de control hay que conocer bien la epidemiología de la zona y se recomienda, entre otros métodos de diagnóstico, el recuento de huevos en heces combinado con el estudio del rendimiento productivo del ganado (Charlier y col., 2014).

“ De esta manera, es posible reducir los síntomas que presenten, evitar altas concentraciones de nematodos en heces, ahorrar en el coste de fármacos, disminuir la presión de selección de resistencia de los nematodos y, por ende, también las pérdidas productivas. ”

Este método hay que diferenciarlo del tratamiento selectivo dirigido (TST – *Targeted Selective Treatment*), que consiste en el tratamiento individual manteniendo una parte de la población de nematodos en “refugio”, sin que entren en contacto con antiparasitarios, con el objetivo de que no desarrollen resistencia y continúen aportando genes de susceptibilidad a la población total (Charlier y col., 2018; Jackson y col., 2009; Kenyon y Jackson, 2012; van Wyk y col., 2006). Debido a que la mayoría de los parásitos de una población se concentran en un bajo porcentaje de animales del rebaño (Torres-Acosta y Hoste, 2008; van Wyk y col., 2006), el tratamiento se aplicará sólo a esos animales, considerados los más susceptibles (presentan síntomas/poseen una mayor carga parasitaria), y en el momento adecuado (conociendo la epidemiología) (Kenyon y col., 2009). De esta manera, es posible reducir los síntomas que presenten, evitar altas concentraciones de nematodos en heces, ahorrar en el coste de fármacos, disminuir la presión de selección de resistencia de los nematodos (Charlier y col., 2018; Torres-Acosta y Hoste, 2008) y, por ende, también las pérdidas productivas. Sin embargo, para saber a qué animales tratar, se debe realizar un diagnóstico previo en el rebaño, mediante marcadores parasitológicos, fisiopatológicos o de producción (Tabla 2). Los métodos de diagnóstico representados en la tabla son los más usuales, pero se continúa en la búsqueda y aplicación de nuevas tecnologías que puedan mejorar el rigor de los existentes (Kenyon y col., 2009). Aunque muchos autores consideran que en el futuro se dependerá más del TST, insisten en una mayor investigación de ellos y de nuevos sistemas de diagnóstico, para mejorar su aceptación por parte de los ganaderos (Charlier y col., 2014).

MARCADOR	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>FAMACHA®</b>	Valoración del grado de anemia según el color de la conjuntiva del ojo (1-5). En general, se aplica tratamiento cuando el valor se encuentra en 3-5.	Técnica efectiva, simple y de bajo coste.	Sólo aplicable a parásitos hematófagos. Otras enfermedades pueden causar pérdida de sangre.
<b>Condición corporal</b>	Estimación visual y por palpación del estado corporal basado en una escala del 1 (muy delgado) al 5 (muy grueso). Algunos autores sugieren tratar cuando llegan al valor 2.	Técnica rápida. Técnica prometedora en ovejas.	Poco sensible. Menos preciso que la ganancia de peso. Otras enfermedades pueden causar pérdida de peso.
<b>Ganancia de peso</b>	Consiste en tratar al grupo de animales con menor tasa de crecimiento del rebaño.	No penaliza el rendimiento de estos, en comparación con lo que ocurriría en el resto si no se trataran. Si el proceso de pesaje se automatiza, se ahorra tiempo y trabajo.	Para parásitos no hematófagos. Otros factores pueden causar pérdida de peso. Hay que invertir tiempo en la técnica o dinero en sistemas de pesaje.
<b>Producción láctea</b>	Selección de las hembras con mayor tasa de producción láctea y de las que se encuentran en su primera lactación para el tratamiento, al ser las más susceptibles.	Consigue disminuir la frecuencia de tratamiento antihelmíntico sin afectar negativamente a la producción. Fácil medición	Marcador poco preciso en vacas.
<b>Recuento de huevos en heces</b>	Administración del tratamiento cuando se estima una cantidad de huevos en heces elevada en la granja.	Resultados positivos en diversos estudios.	Baja correlación con el rendimiento productivo del animal y el grado de infección. Alto coste y laborioso. No hay umbral definido para el tratamiento.

Tabla 2 Marcadores comúnmente propuestos para la selección de animales en el tratamiento selectivo.

Fuentes: Hoste y col., 2002; van Wyk y col., 2006; Jackson y col., 2009; Kenyon y col., 2009; Kenyon y Jackson 2012; Charlier y col., 2018.

### 3.2. MANEJO DE PASTOS

Hay diferentes métodos que se centran en el manejo del pasto para impedir o reducir el contacto del ganado con las larvas infectantes presentes en la vegetación (Bowman, 2011; Hoste y Torres-Acosta, 2011) valiéndose del hecho de que los estadios de vida libre se encuentran en el medio durante un periodo limitado de tiempo (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

El sistema de rotación de pastos (Figura 11) se encuentra entre ellos. Consiste en dividir el área de pasto en secciones, de manera que el ganado irá rotando entre ellas en cortos periodos de tiempo, para evitar que entren en contacto con las larvas L3 que puedan surgir de huevos depositados en heces. Para ello, se respetará el tiempo necesario hasta asegurar que la sección esté libre de larvas infectantes y reintroducir al rebaño en ella (Bowman, 2011). Los inconvenientes de este método es que, además de ser costoso (Bowman, 2011), resulta poco efectivo en climas templados, donde los estadios de vida libre permanecen vivos durante más tiempo en el medio que en los tropicales, en los que parece tener una mayor utilidad (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

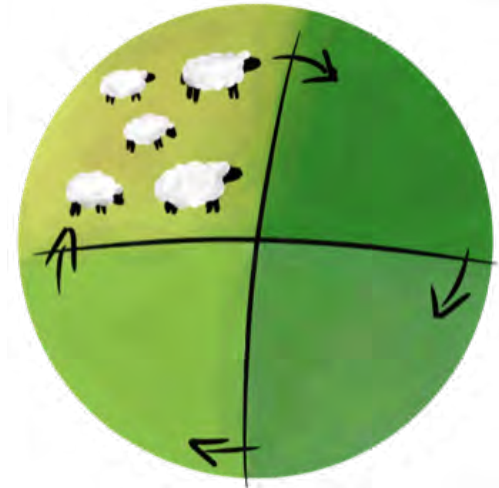


Figura 11. Rotación de pastos.

Una variante es un pastoreo intensivo en parcelas pequeñas "*intensive cell grazing*", que se diferencia del anterior en que el área se divide en muchas secciones pequeñas (menores de 0,5 hectáreas), albergando altas concentraciones de animales en cada una, realizando la rotación cada 2 días como máximo (en la rotación de pastos convencional se realizan, al menos, cada semana) y manteniendo de media periodos más largos de descanso en cada sección (Ruiz-Huidobro y col., 2019). Aunque no siempre se consigue disminuir la cantidad de huevos excretados en el pasto respecto al sistema de rotación de pastos convencional, podría implementarse como una herramienta para mejorar la producción y sostenibilidad de las explotaciones (Ruiz-Huidobro y col., 2019).

Otro método cuyo fin es reducir la cantidad de larvas infectantes en el pasto es el pastoreo mixto. Consiste en que dos especies de animales diferentes (excepto entre pequeños rumiantes) pastoreen en la misma zona o alternen su presencia en ella (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Kearney y col., 2016), basándose en la especificidad que presentan los nematodos por determinadas especies de animales. Sin embargo, existen parásitos que infectan a diferentes especies, como *Trichostrongylus axei* (Stear y col., 2007), y otros que, aun siendo específicos, han sido capaces de adaptarse a otros hospedadores en infecciones experimentales (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

El movimiento del ganado más susceptible (hembras en periparto y animales jóvenes) hacia zonas de pastoreo libres de larvas infectantes es una opción aconsejable que se ha practicado en ganadería (Stear y col., 2007). "Tradicionalmente" se tratan con antihelmínticos antes de movilizarlos, pero actualmente se recomienda tratarlos con posterioridad (Torres-Acosta y Hoste, 2008), es decir, es aún controvertido. Esto se debe a que los parásitos que sobrevivían al tratamiento se instauraban en el medio, creando una población resistente e impidiendo que se produjera el concepto de "refugio", del que hablamos anteriormente (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Kenyon y col., 2009). Otra consecuencia que podría darse es que, al mover sólo animales susceptibles, perdemos el efecto que generaban los animales resistentes al "diluir" el número de nematodos en el medio (Bowman, 2011).

No obstante, considerando lo anterior, sería necesario un estudio previo del clima y condiciones de la granja para implementar el método más adecuado (Kearney y col., 2016).

### 3.3. CONTROL BIOLÓGICO

Se ha investigado extensamente cómo eliminar las larvas infectantes del pasto mediante agentes biológicos, pero pocos métodos han conseguido ser aplicables en el medio (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

La opción más estudiada y con resultados más prometedores ha sido la administración de hongos nematofagos como método profiláctico frente tricostrongídeos (FAO, 2002; Rocha y col., 2007; Hoste y Torres-Acosta, 2011). Estos consiguen disminuir la población de larvas infectantes en heces antes de que éstas migren a la vegetación (Hoste y Torres-Acosta, 2011; Charlier y col., 2018). La especie *Duddingtonia flagrans* (Figura 12) destaca entre el resto por ser capaz de sobrevivir a su paso por el tracto digestivo de los animales en forma de esporas, permitiendo que sigan siendo funcionales una vez vuelven al medio a través de las heces de los animales (Gómez-Rincón y col., 2006; Torres-Acosta y Hoste, 2008). Sin embargo, su aplicación en la granja ha arrojado resultados variables (Gómez-Rincón y col., 2006), presentando ciertos inconvenientes como, por ejemplo, el hecho de que se necesite administrar esporas frecuentemente a los animales para que sea efectivo el tratamiento (Stear y col., 2007; Charlier y col., 2018), ya que durante la digestión ruminal del ganado se producen pérdidas importantes de éstas (Ojeda-Robertos y col., 2009); y, también, por la posible vulnerabilidad que pueden presentar a las condiciones climáticas (Epe y col., 2009). A pesar de ello, ya hay un producto comercializado, BioWorma® (<https://www.bioworma.com>), que ha obtenido resultados positivos, disminuyendo significativamente el número de larvas infectantes en équidos, vacuno y caprino (Healey y col., 2018).



Figura 12. Larva de NGI atrapada por *Duddingtonia flagrans*.

### 3.4. CONTROL MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN

El parasitismo puede afectar al crecimiento y a la producción de leche o lana debido al desvío de nutrientes hacia el mantenimiento de la respuesta inmune, entre otros (Charlier y col., 2018). Por este motivo, la alimentación del ganado ha sido estudiada en busca de elementos que fueran capaces de disminuir la parasitación y/o sus síntomas (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Una opción interesante para reducir estos efectos es el aporte proteico, con el que se ha observado una disminución de la contaminación larvaria de los pastos cuando se administraba a hembras en periparto (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Además, hay estudios en ganado caprino que indican que el aporte proteico presenta mejores resultados en los animales más productivos (Chartier y col., 2000). Asimismo, este método no representa una gran inversión económica ya que se puede suplementar con fuentes proteicas de bajo coste, como por ejemplo los bloques nutricionales de urea/melaza (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Sin embargo, puede resultar difícil conocer cuánta cantidad es necesaria para cada individuo (Torres-Acosta y Hoste, 2008).



Figura 13. Forraje.

Por otro lado, existen plantas que aparte del aporte nutricional, presentan propiedades antihelmínticas. En general, su investigación se ha centrado en el forraje bioactivo que contenía polifenoles, destacando los taninos condensados (Kearney y col., 2016; Vercruyse y col., 2018), aunque en este caso, hay que tener en consideración que en altas concentraciones pueden ser tóxicos y también disminuir la digestibilidad de algunos nutrientes (Kearney y col., 2016). El estudio de forrajes bioactivos ha obtenido resultados variables, atribuyéndose a factores tecnológicos, del medioambiente y genéticos (Charlier y col., 2018). A pesar de ello, se considera un método de control interesante y que necesita un mayor estudio para su uso en el futuro (Charlier y col., 2018). Asimismo, estos compuestos se han asociado con una mejora de la inmunidad frente a NGI en pequeños rumiantes, aunque no está claro si se debe al aporte de proteína o si realmente son inmunoestimulantes (Charlier y col., 2018).

Otra alternativa que se ha investigado es el aporte de oligoelementos. El más estudiado ha sido el uso de partículas de óxido de cobre (COWP - *Copper oxide wire particles*-), que comenzó con el objetivo de paliar la falta de este metal en rumiantes. Posteriormente, se descubriría que también tenía propiedades antihelmínticas (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Sin embargo, es importante especificar que los resultados más consistentes se han producido frente a la especie *H. contortus*. Mientras que frente a otros nematodos como *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. han sido más variables (Hoste y Torres-Acosta, 2011).

### 3.5. SELECCIÓN GENÉTICA

En la naturaleza podemos encontrar tanto individuos como razas que presentan variabilidad genética (Figura 14) en resistencia, resiliencia o combinación de ambas, frente a la mayoría de las enfermedades estudiadas hasta ahora (Gibson y Bishop, 2005). Se considera que un animal es resistente a NGI cuando consigue regular la población de vermes, disminuyendo la carga parasitaria o la longitud y fecundidad de estos (Bishop, 2012; Meana y Rojo-Vázquez, 1999; Stear y col., 1995). Mientras que la resiliencia se relaciona con la tolerancia a la enfermedad, al describirse como la habilidad de los animales a no enfermar y mantener la producción durante la parasitación (Bishop, 2012; Bisset y Morris, 1996). La selección genética se basa en utilizar como herramienta la heredabilidad de ambos caracteres como método de control de NGI (Bisset y Morris, 1996; McManus y col., 2014; Piedrafita y col., 2010).



Figura 14. ADN.

Dado que la resistencia frente a nematodos es poligénica y los vermes tienen que adaptarse a muchas "dianas" diferentes (Bishop, 2012; McManus y col., 2014), una ventaja que presenta este método es el generar una menor presión de selección en el parásito para que este mute, a diferencia de los antihelmínticos y, por ello, es más sostenible a largo plazo (Bishop, 2012; Gibson y Bishop, 2005; Piedrafita y col., 2010). Por este motivo, hoy en día se establecen programas de selección genética en base a la resistencia y a la resiliencia frente a NGI (McManus y col., 2014). Si bien existen programas enfocados a cada uno por separado, la combinación de ambos es beneficiosa ya que además de influir en el impacto de la enfermedad en los animales, también afectaría a la epidemiología (Bishop, 2012).

**A**unque la mejora genética puede basarse en la utilización de genes, no está claro cuál (es) podrían ser útiles para la selección y, por ello, se recurre a otras herramientas como las que se mencionan a continuación.

Por ejemplo, el uso de valores fenotípicos como indicadores de resistencia, para estimar la variabilidad que presentan entre y dentro de razas (Dominik, 2005). Se han estudiado diferentes caracteres fenotípicos en rumiantes como marcadores indirectos, tanto relacionados con la resistencia (recuento de huevos en heces o anticuerpos específicos frente al parásito -IgA, IgG e IgM-, como con la resiliencia y el impacto de la parasitación (tasa de crecimiento o indicadores de anemia) (McManus y col., 2014). De ellos, el principal indicador que se ha utilizado hasta ahora es el recuento de huevos en heces (Bishop, 2012; Stear y Wakelin, 1998), presentando una heredabilidad de entre 0,2-0,4 (Bishop, 2012; McManus y col., 2014; Stear y Wakelin, 1998; Vagenas y col., 2002). La principal ventaja de la utilización de este indicador es que, además de conseguir disminuir el número de vermes en el hospedador, puede reducir la contaminación de los pastos y, por tanto, su transmisión al resto del ganado (Torres-Acosta y Hoste, 2008). En la actualidad existen programas de selección realizados en base a este indicador (Moreno-Romieux y col., 2017) e incluso se promueve este método gracias a programas comerciales como *WormBoss* en Australia (<http://www.wormboss.com.au>). También hay que destacar otro marcador fenotípico que cada vez se usa con más frecuencia en Nueva Zelanda, el test CarLa (<https://www.agresearch.co.nz/partnering-with-us/products-and-services/carla-saliva-test/>). Este está basado en IgA específica de un antígeno de superficie de la L3 de *Trichostrongylus colubriformis*, asociado a resistencia. De esta manera, esta prueba mide la IgA específica en saliva de animales infectados utilizando el antígeno de superficie, donde una mayor reacción CarLa se relaciona con un menor recuento de huevos en heces y un mejor crecimiento de los animales infectados (McManus y col., 2014). Además, se ha observado que las respuestas de IgA específica de antígeno presentan el doble de heredabilidad que el recuento de huevos en heces, por lo que podría suponer un mejor carácter de selección de resistencia (Fairlie-Clarke y col., 2019).

Otra opción sería el uso de razas locales, que han evolucionado y adquirido naturalmente mecanismos de resistencia frente a estas infecciones al haberse adaptado a exposiciones elevadas de parásitos con un nivel de mantenimiento mínimo (Gibson y Bishop, 2005). Sin embargo, la demanda de productos de origen animal ha incentivado la tendencia a introducir razas más productivas, a costa de desplazar las razas locales existentes que se mantenían hasta ahora por su valor cultural y rusticidad (Piedrafita y col., 2010; Torres-Acosta y Hoste, 2008). Estas razas, que consideramos como comerciales, han sobrevivido hasta ahora gracias al tratamiento con antihelmínticos, pasando genes no resistentes de generación en generación (Piedrafita y col., 2010). Por este motivo, hoy en día se intenta

evitar esta práctica y en muchos lugares se buscan otros métodos para mejorar la productividad, por ejemplo, seleccionando animales resistentes dentro del ganado/raza (Torres-Acosta y Hoste, 2008). A fin de preservar las razas locales y sus genes, la FAO ha destacado el papel que ejercen en ciertos ecosistemas y ha creado un banco de genes (embriones/semes) de algunas de ellas, además del banco de datos ya existente donde podemos consultar el estado de los recursos genéticos de estos animales a escala global (FAO, 2007; Torres-Acosta y Hoste, 2008). Con todo, es difícil evitar la dilución genética que se produce debido al cruce indiscriminado de razas, lo cual es considerado como una gran amenaza a la diversidad genética (FAO, 2007).

“ Otra opción sería el uso de razas locales, que han evolucionado y adquirido naturalmente mecanismos de resistencia frente a estas infecciones al haberse adaptado a exposiciones elevadas de parásitos con un nivel de mantenimiento mínimo. ”

Algunas de las razas ovinas clasificadas como resistentes a nematodos gastrointestinales son la Barbados Black Belly (Aumont y col., 2003), Red Maasai (Mugambi y col., 1997), Gulf Coast Native (Li y col., 2001), St Croix (Stear y Murray, 1994) y la oveja Canaria de Pelo (González y col., 2008). Esta última corresponde a una de las dos razas autóctonas que se pueden encontrar en las Islas Canarias. La oveja Canaria de Pelo (Figura 15) es de origen africano y fue traída por los primeros habitantes de las islas, que la criaron durante años hasta ser posteriormente exportada al continente americano, justo después de su descubrimiento. Allí se adaptó y, hace relativamente pocos años, fue reintroducida en Canarias, donde se explota por su aptitud cárnica (Ministerio de Agricultura, 2021) Se caracteriza por la resistencia mostrada frente a *H. contortus* en inoculaciones experimentales (González y col., 2008) y en infecciones mixtas naturales de este nematodo en conjunto con *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. (Hernández, 2015)



Figura 15. Imagen de corderos de la raza Canaria de Pelo.

Una herramienta que nos sirve para identificar los mecanismos implicados en la resistencia frente a NGI es la transcriptómica, a través del estudio de los genes y del nivel de expresión que presentan en animales resistentes y susceptibles. Por ejemplo, se ha estudiado el transcriptoma de la mucosa abomasal de las dos razas ovinas canarias, raza Canaria de Pelo (resistente) y raza Canaria (susceptible), en un ensayo donde fueron infectadas con *H. contortus* (Guo y col., 2016). En él se observó que la raza Canaria de Pelo (CAP) presentaba una mayor expresión de genes relacionados con las siguientes rutas: respuestas inflamatorias agudas de fácil inducción, activación del complemento, proliferación celular acelerada y subsiguiente reparación tisular, e inmunidad dirigida contra la fecundidad del parásito. Todas ellas parecen estar implicadas en el desarrollo de resistencia de esta raza (Guo y col., 2016).

Tanto esta, como todas las razas mencionadas anteriormente se caracterizan por responder a la infección de forma efectiva. Aunque no se conocen exactamente los mecanismos mediante los cuales cada una consigue impedir o disminuir la infección por NGI, se ha estudiado la respuesta inmune que ocurre generalmente frente a estos.

### Respuesta inmune

Los helmintos necesitan mantener una relación parásito-hospedador balanceada para poder sobrevivir, por lo que generalmente las enfermedades que producen cursan de forma subclínica (Tizard, 2009). Sin embargo, el que causen mayor o menor patología, va a depender, entre otras cosas, del grado de desarrollo de la respuesta inmune del hospedador. En él van a influir factores intrínsecos del animal que pueden alterar este equilibrio, como: edad, sexo, raza, genética, estado reproductivo, nutricional o comportamiento (Guo y col., 2016; Hayward, 2013; McRae y col., 2015; Piedrafita y col., 2010; Strain y col., 2002) y factores externos a él: especie de nematodo, intensidad de la infección o suplementación nutricional (Hayward, 2013; Stear y col., 2003; Tizard, 2009).

En ovino, el desarrollo de inmunocompetencia frente a los NGI comienza a manifestarse en los primeros meses de vida, aunque necesitan exponerse regularmente a ellos para poder conseguir una respuesta inmune protectora, que suele alcanzarse a los 10-12 meses de edad (McRae y col., 2015). Esta inmunocompetencia frente a NGI se ha relacionado tanto con la disminución de la carga parasitaria al prevenir el establecimiento de la mayor parte de larvas infectantes y favorecer la expulsión de vermes adultos, así como con el acortamiento y descenso de la fecundidad de los vermes (McRae y col., 2015; Stear y col., 1995).

La respuesta inmune frente al nematodo *T. circumcincta* comienza cuando entra al organismo del hospedador y “expone” sus antígenos, generándose una respuesta inespecífica cuyo objetivo es el de eliminar al patógeno lo más rápidamente posible y reparar los daños que haya podido causar (Tizard, 2009). Sin embargo, para desarrollar un mecanismo de defensa frente al parásito, es necesaria la exposición repetida a él y requiere de días para que se pueda generar una respuesta inmune específica (Balic y col., 2000). De esta forma, se producirá el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T inmaduros, que derivará en una diferenciación y proliferación de linfocitos B y T. Ambos tipos de respuestas coexisten en el tiempo y en ellas se encuentran involucradas diversas células, citoquinas y anticuerpos (McRae y col., 2015; Tizard, 2009).

La larva infectante al entrar causa daño en el epitelio de la mucosa abomasal, generando una reacción inflamatoria local, donde se reclutan mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células Natural Killer (NK) (McRae y col., 2015) (Figura 16). Las células presentadoras de antígeno, como las dendríticas y los macrófagos, van a “captar” los antígenos parasitarios y migrar hacia los linfonodos regionales para presentárselos a los linfocitos T inmaduros. Debido a ello, se producen diferentes citoquinas que promueven la diferenciación de estas células en función de la respuesta que sea estimulada -Tipo 1 o Tipo 2- (Aboshady y col., 2020). Estas respuestas se consideran antagonistas y, aunque normalmente el parasitismo por nematodos induce un mayor desarrollo de la respuesta Tipo 2, en ocasiones también se observan respuestas Tipo 1 (asociada a infecciones de parásitos intracelulares), generalmente en razas o individuos susceptibles que no responden adecuadamente a la infección (Aboshady y col., 2020; Hayward, 2013), aunque otros estudios han detectado respuestas típicas de tipo 1, por ejemplo con altos niveles de IFN- $\gamma$  en animales resistentes y se ha sugerido que se trata de un balance más correcto entre ambas respuestas en ovino (Colditz y col., 1996; Venturina y col., 2013). La respuesta Tipo 2 consiste en la activación de las células a través de la vía alternativa, generando interleuquina 4 (IL-4), IL-5, IL-10 e IL-13, que van a inducir la producción, activación y desplazamiento de mastocitos y eosinófilos hacia la zona de infección (Mantovani y col., 2013; McRae y col., 2015). También estimulan la diferenciación de células B inmaduras en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos frente al parásito (McRae y col., 2015). En presencia de IL-5 se produce IgA y se activan los eosinófilos promoviendo su degranulación sobre las larvas, lo que podría contribuir al mecanismo de expulsión tardía de ellas (Balic y col., 2002; McRae y col., 2015). Por otra parte, la IgA está relacionada con el mecanismo de resistencia adquirida frente a L4 mediante la supresión mediada del crecimiento de estas, de manera que, indirectamente se estaría afectando la longitud del estadio adulto final y la reducción de la prolificidad, al disminuir el número de huevos debido al tamaño del verme (Balic y col., 2000; Henderson y Stear, 2006).

Después de infecciones repetidas, la IL-4 estimula la producción de IgG (especialmente de la subclase IgG1) e IgE específica frente al parásito por parte de las células plasmáticas (Aboshady y col., 2020; Tizard, 2009). La IgE se va a unir a los mastocitos activándolos, considerándose entonces leucocitos globulares (Balic y col., 2000). Por lo que, en las siguientes infecciones, las larvas van a estimular de esta manera una degranulación de ellos (Aboshady y col., 2020; Venturina y col., 2013). Esto hace que se liberen más mediadores proinflamatorios, que estimulan una respuesta de hipersensibilidad tipo 1, aumentando la producción del mucus del tracto gastrointestinal y el peristaltismo intestinal. Contribuyen, de esta forma, a la expulsión rápida de las larvas L3, al dificultar su establecimiento y supervivencia, así como de los vermes adultos (Balic y col., 2002; McRae y col., 2015).

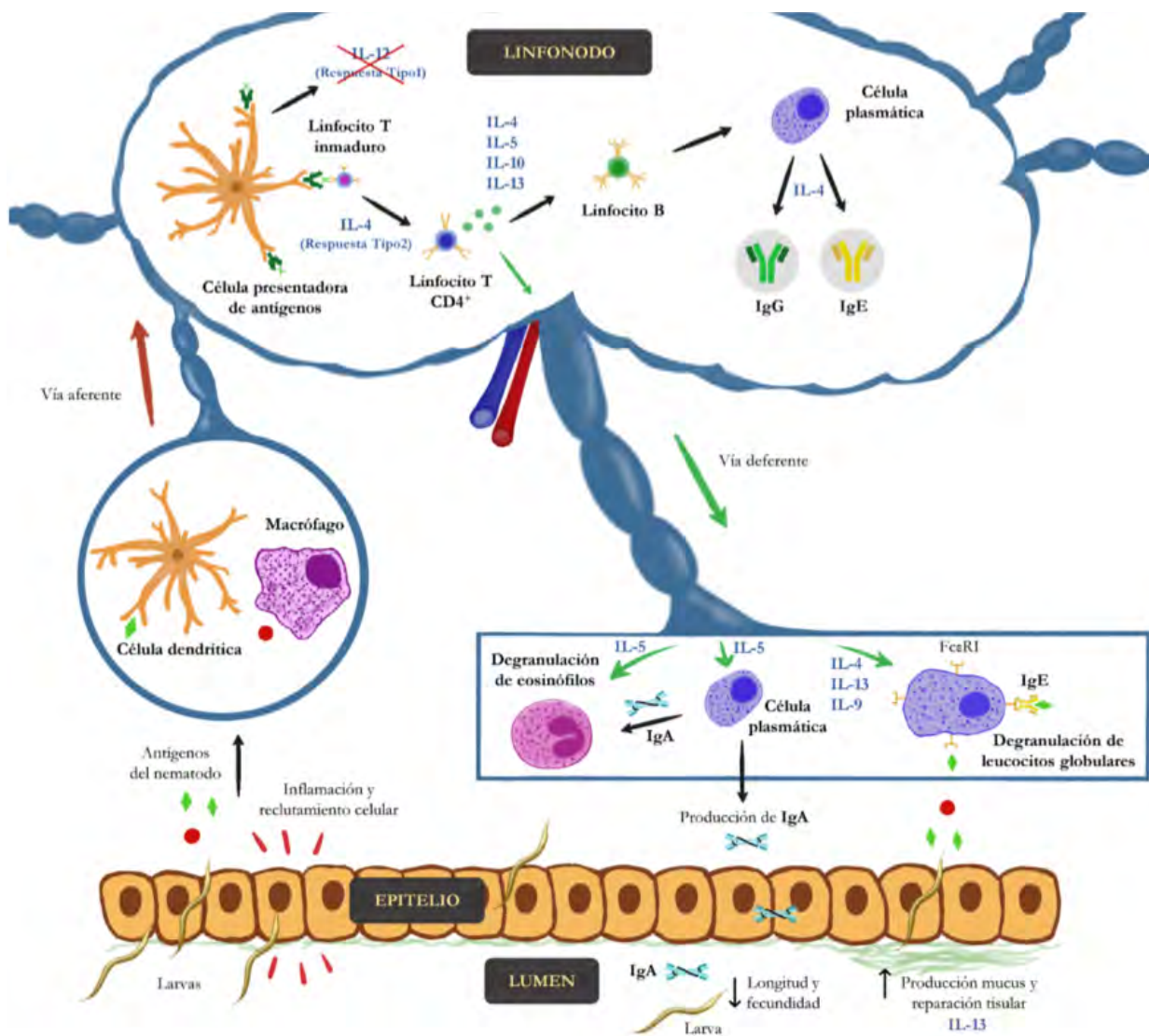


Figura 16 . Representación de la respuesta inmune frente a nematodos gastrointestinales (Adaptado de McRae y col., 2015).

Aunque todo ello parece constituir el principal mecanismo de resistencia frente a este parásito en corderos, los eosinófilos no parecen jugar un rol importante en la respuesta frente a *T. circumcincta*, a diferencia de lo que ocurre con otro nematodo gastrointestinal, *H. contortus*. Es más, una marcada eosinofilia durante la infección con *T. circumcincta* se ha relacionado con una mayor susceptibilidad (Henderson y Stear, 2006). Por lo que, parece que la IgA (regulando longitud y número de huevos en útero de los vermes) y la IgG1 e IgE específicas del parásito, junto a los leucocitos globulares (controlando la carga parasitaria), son las principales herramientas que tiene el ganado ovino para defenderse de las infecciones de *T. circumcincta* (Aboshady y col., 2020; Henderson y Stear, 2006; McRae y col., 2015; Stear y col., 1995).

En relación con la respuesta inmune de la raza Canaria de Pelo (resistente) frente a NGI, en experiencias anteriores de nuestro grupo de investigación, se ha observado que la respuesta generada frente a infecciones experimentales de *H. contortus* está relacionada principalmente con la activación de eosinófilos, IgA y células  $T\gamma\delta/WC1+$ , modulando la fecundidad del estadio adulto (González y col., 2008, 2011). Aunque también se ha observado menores recuentos de huevos en heces en ovinos de esta raza expuestos a infecciones naturales mixtas en las que predominaban las especies/género *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. (Hernández, 2015), no se conocen los mecanismos responsables de esta protección.

### 3.6. VACUNAS

Las vacunas (Figura 17) frente a parásitos son una alternativa atractiva, con la que se trata de estimular una respuesta inmune eficaz en los animales, para aumentar la producción y mejorar el bienestar animal. Además, nos permite reducir la presencia de residuos químicos en el medioambiente, al requerir una menor frecuencia de tratamientos farmacológicos durante el año (Vercruyse y col., 2018). Sin embargo, el desarrollo y comercialización de vacunas frente a parásitos se ha encontrado con diversos obstáculos a lo largo del tiempo (Matthews y col., 2016). Por ello, es de destacar, que actualmente se comercialicen 3 vacunas frente a helmintos de rumiantes: "Barbervax<sup>®</sup>" / "Wirevax<sup>®</sup>" (de antígeno nativo del nematodo *H. contortus*, en Australia, Reino Unido y Sudáfrica); "Bovilis Huskvac<sup>®</sup>" (del nematodo *Dictyocaulus viviparus* vivo atenuado); y "Providean Hidatil EG 95<sup>®</sup>" (de antígeno recombinante del cestodo *Echinococcus granulosus*, en Sudamérica) (Claerebout y Geldhof, 2020; Matthews y col., 2016).



Figura 17. Vacuna.

Para que una vacuna se considere efectiva debe conseguir reducir los síntomas de la enfermedad y las pérdidas productivas, aunque existen vacunas cuyo efecto es poco duradero, así que su utilidad va a depender de las condiciones climáticas y de manejo de la explotación ganadera. De igual manera, se recomienda que el uso de vacunas vaya acompañado de otros métodos de control y se realice el diagnóstico para localizar y tratar, o apartar del rebaño, a los animales que no responden a la vacuna (Vercruyse y col., 2018). Sin embargo, en la actualidad no se persigue una inmunidad total del rebaño y se le da mayor importancia a buscar vacunas multivalentes, combinando antígenos o usando moléculas presentes en diferentes especies (Matthews y col., 2016).

“ Para que una vacuna se considere efectiva debe conseguir reducir los síntomas de la enfermedad y las pérdidas productivas, aunque existen vacunas cuyo efecto es poco duradero, así que su utilidad va a depender de las condiciones climáticas y de manejo de la explotación ganadera. ”

Las vacunas frente a NGI pueden componerse del parásito en su totalidad (debilitado/atenuado), como es el caso de vacunas de parásito irradiado (Claerebout y Geldhof, 2020). La primera vacuna comercializada frente a helmintos de rumiantes era de este tipo y consistía en larvas vivas irradiadas de *Dictyocaulus viviparus*, nematodo pulmonar que afecta al ganado bovino. Ésta se desarrolló en la década de los 50 y se distribuyó bajo el nombre de Dictol<sup>®</sup>, cambiándolo posteriormente a Bovilis Huskvac<sup>®</sup> (MSD Animal Health), la cual continúa utilizándose en la actualidad (Britton y col., 2020; Jarrett y col., 1959; Matthews y col., 2016). Si bien ha habido posteriores intentos de inmunización con diferentes especies de nematodos atenuados por irradiación, no se ha obtenido el éxito esperado (Britton y col., 2020).

Por otro lado, existen vacunas basadas en antígenos, que pueden clasificarse atendiendo a su naturaleza. Se consideran nativas si los antígenos forman parte o son producidos por el parásito, y recombinantes cuando estos se sintetizan a partir de sistemas de expresión (Nisbet y col., 2016). La producción de antígenos nativos requiere infectar a animales para obtener los parásitos y, en algunos casos, sacrificarlos (si necesitamos vermes adultos), además de garantizar la cadena de frío, lo que, entre otras cosas, limita la distribución de la vacuna (Matthews y col., 2016). Asimismo, es necesario que las vacunas sean de fácil producción y uniformes, para que sean comercialmente viables. Esto es difícil de conseguir cuando purificamos los vermes para extraer antígenos naturales, por ello se estudia como reproducirlos en su forma recombinante. De esta manera, se podría reducir el coste de producción y la variabilidad entre lotes, facilitando su comercialización (Charlier y col., 2018). Sin embargo, conseguir recrear la conformación correcta de la molécula deseada es complicado y, hasta ahora, se ha observado que en la mayoría de los estudios no generan respuesta (Matthews y col., 2016).

Además de esta clasificación, las vacunas se pueden catalogar según el origen del antígeno. Los denominados antígenos ocultos son aquellos que generalmente no se exponen al sistema inmune del hospedador. Es el caso de los que componen la vacuna "Barbervax<sup>®</sup>" / "Wirevax<sup>®</sup>", producida a partir de proteínas nativas, de la membrana intestinal del nematodo *H. contortus* (aminopeptidasa H11 y complejo glicoproteico H-gal-GP) (Claerebout y Geldhof, 2020; Matthews y col., 2016). Se cree que el éxito de esta vacuna reside en que *H. contortus*, al alimentarse de la sangre del animal, recibe los anticuerpos de éste, posiblemente afectando al intestino del parásito alterando digestión (Nisbet y col., 2016; Schallig, 2000). Por esta razón, es capaz de proteger a los animales que presentan una inmunidad natural débil o poco efectiva. Sin embargo, las infecciones parasitarias no re-estimulan la respuesta inmune de los animales al no exponerse al antígeno, por lo que el efecto de la inmunización es poco duradero y son necesarias dosis constantes de ella (Claerebout y Geldhof, 2020). No obstante, el corto periodo de duración que presenta no supone un problema en países con pastoreo limitado a ciertas épocas del año o si se realiza manejo de pasto (Vercruysse y col., 2018). Asimismo, se ha intentado desarrollar su forma recombinante, pero, hasta ahora, no ha conseguido estimular la respuesta inmune del ganado (Matthews y col., 2016).

“ Además de esta clasificación, las vacunas se pueden catalogar según el origen del antígeno. Los denominados antígenos ocultos son aquellos que generalmente no se exponen al sistema inmune del hospedador. ”

Otro tipo de antígenos son los de ES (excreción/secreción), proteínas liberadas por el parásito en el hospedador o en cultivos "in vitro" para la producción de vacunas (Claerebout y Geldhof, 2020) Un ejemplo es el prototipo de 8 proteínas recombinantes de *T. circumcincta* desarrollado por Nisbet y col., 2013, que contiene diversos productos de ES del parásito, como Tci-ES20, Tci-MEP-1 y Tci-APY-1.

Por último, las vacunas de antígeno somático son aquellas desarrolladas a partir de proteínas que se encuentran en el cuerpo del parásito. Hace algunos años, un grupo de investigación español dirigido por el Dr. Alunda (Universidad Complutense de Madrid) desarrolló una vacuna con la versión recombinante expresada en *E. coli* de una proteína somática del estadio adulto de *H. contortus* (Hc23), a la cual se le había atribuido un efecto protector con anterioridad (Fawzi y col., 2015a). La inmunización en corderos dio como resultado una reducción superior al 80% en el recuento de huevos en heces y de adultos en abomaso respecto al grupo control (no vacunado e infectado). Estos niveles de protección son similares a los alcanzados en experiencias que han utilizado antígenos nativos, por lo que se trata de un hallazgo prometedor en la producción de proteínas recombinantes (Fawzi y col., 2015b).

Además, tanto las vacunas de antígeno somático como las de productos de ES, mantienen su efecto protector durante más tiempo que las de antígeno oculto, ya que son antígenos expuestos al sistema inmune del hospedador y la infección con el parásito produce un “boost” en la respuesta inmune. Aun así, la duración puede estar condicionada por el sistema inmune del animal y las características de la explotación ganadera (Claerebout y Geldhof, 2020).

La elección del adyuvante apropiado depende de los antígenos que componen la vacuna y se ha observado que éste puede ser el causante de que ésta sea o no eficaz (Charlier y col., 2018). Normalmente, en las vacunas frente a nematodos se tiende a estimular una respuesta celular (Tipo2), al conocerse como la respuesta protectora frente a helmintos, con adyuvantes como el hidróxido de aluminio (Fawzi y col., 2015b). Sin embargo, se ha observado eficacia en adyuvantes estimulantes de la respuesta humoral (Tipo1) como Quil A, en vacunaciones frente a *T. circumcincta* (Matthews y col., 2016; Nisbet y col., 2013).

Por último, es importante destacar que las vacunas frente a NGI deben presentar una relación coste/efectividad que atraiga a los ganaderos, ya que, aunque se financian proyectos de vacunas frente a parásitos incluso con gran dotación presupuestaria (ej. PARAGONE: vaccines for animal parasites), las autoridades no consideran la lucha frente a estos como un tema prioritario (Claerebout y Geldhof, 2020; Vercruyse y col., 2018). Por este mismo motivo, sería ideal conseguir desarrollar vacunas capaces de proteger al ganado de múltiples especies a la vez (Matthews y col., 2016). No obstante, antes de alcanzar estos objetivos, es vital seguir investigando la relación parásito/hospedador para ser capaces de orientar la respuesta inmune y elegir el adyuvante apropiado. Y, además, conseguir la conformación espacial adecuada de las proteínas recombinantes producidas (Claerebout y Geldhof, 2020; Matthews y col., 2016).

“Además, tanto las vacunas de antígeno somático como las de productos de ES, mantienen su efecto protector durante más tiempo que las de antígeno oculto, ya que son antígenos expuestos al sistema inmune del hospedador y la infección con el parásito produce un “boost” en la respuesta inmune.

”

#### Vacuna recombinante frente a *Teladorsagia circumcincta* (Nisbet et al., 2013)

Se trata de un prototipo vacunal que contiene 8 antígenos recombinantes, descritos en la tabla 3. Para estudiar su efectividad, inicialmente se realizaron dos ensayos en corderos de cruce de Texel. En ambos se siguió el mismo protocolo, que consistía en la administración subcutánea de la vacuna un total de 3 veces, cada 3 semanas junto con el adyuvante Quil A a los grupos vacunados, mientras que a los grupos controles se les administraba sólo el adyuvante. A continuación, se les sometía a infecciones experimentales mediante inoculaciones de larvas infectantes de *T. circumcincta*. El primer ensayo se llevó a cabo en corderos de 204-206 días de edad, observándose una reducción media del 70% de huevos en heces y del 75% de vermes adultos en abomaso en el grupo vacunado respecto al grupo control. En el segundo ensayo se utilizaron corderos de 172-178 días de edad, estableciéndose cuatro grupos, dos vacunados y dos controles. Un grupo control y otro vacunado se sacrificaron 7 semanas después de la primera inoculación, sin observarse diferencias significativas entre ellos. Los restantes se sacrificaron 4 semanas después de estos, obteniéndose con la inmunización reducciones del 58% de huevos en heces y 57% de nematodos totales en abomaso respecto al control (Nisbet y col., 2013). Posteriormente se llevó a cabo otra experiencia con ovejas en periparto de la misma raza, donde se observó un 45% de reducción en la media del recuento de huevos acumulativo en heces en el grupo vacunado respecto al control (Nisbet y col., 2016).

Antígeno	Función	Sistema de expresión
Tci-SAA-1 (Homólogo del antígeno protector de <i>Ancylostoma caninum</i> de <i>T. circumcincta</i> )	Antígeno de superficie asociado a L3 enriquecida	pET22b(+) <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Tci-MIF-1 ( <i>Macrophage migration inhibitory factor-1</i> )	Factor de inhibición de la migración de macrófagos de L3 enriquecida	pET22b(+) <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Tci-ASP-1 ( <i>Activation-associated secretory protein-1</i> )	Proteína secretora asociada a la activación de L4 enriquecida	pET SUMO <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Tci-TGH-2 (Homólogo de TGF $\beta$ )	Proteína homóloga del factor de crecimiento transformante beta	pET SUMO <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Tci-CF-1 (Cathepsin F-1)	Catepsina F secretada por L4 enriquecida	pPICZ $\alpha$ C <i>Pichia pastoris</i> X33 strain
Tci-ES20 (Proteína de 20kDa con función desconocida)	Proteína de excreción/secreción (ES)	pPICZ $\alpha$ C <i>Pichia pastoris</i> X33 strain
Tci-MEP-1 ( <i>Astacin-like metalloproteinase-1</i> )	Metaloproteinasa de ES de tipo astacina	pET SUMO <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Tci-APY-1 ( <i>Calcium-dependent apyrase-1</i> )	Apirasa activada por calcio de ES de L4 enriquecida	pSUMO <i>E. coli</i> BL21 (DE3)

Tabla 3. Antígenos recombinantes que componen la vacuna frente a *Teladorsagia circumcincta* (Adaptado de Nisbet y col., 2013).

Actualmente, la investigación de este prototipo se ha orientado principalmente a la simplificación de la vacuna, combinando una menor cantidad de proteínas y centrándose en las que hayan logrado estimular la respuesta inmune de los animales durante los ensayos (Matthews y col., 2016; Nisbet y col., 2019). Además, se han realizado diversos ensayos en corderos combinando 4 y 2 antígenos del cóctel de proteínas (Britton y col., 2020). Si bien, en los primeros no hubo una reducción visible de las variables parasitológicas, en los ensayos con la vacuna de dos antígenos, Tci-APY-1/mTci-APY-1 (mutación de apirasa no funcional) y Tci-MEP-1 hubo cierta reducción, la cual mejoró cuando se utilizaba la mutación de Tci-APY-1 (Nisbet y col., 2019).

No obstante, a pesar de que la inmunización con este prototipo vacunal ha generado resultados interesantes, presenta variabilidad en la respuesta entre animales y entre los diferentes ensayos que se han realizado (Nisbet y col., 2019). Estos aspectos, sumados al número de proteínas que precisa el prototipo, son serios obstáculos para su comercialización (Matthews y col., 2016).

## 4 BIBLIOGRAFÍA

1. Aboshady HM, Stear MJ, Johansson A, Jonas E, Bambou JC. 2020. "Immunoglobulins as Biomarkers for Gastrointestinal Nematodes Resistance in Small Ruminants: A Systematic Review." *Scientific Reports*. 2020. 10(1):1–14. doi: 10.1038/s41598-020-64775-x.
2. Aumont G, Gruner L, Hostache G. 2003. "Comparison of the Resistance to Sympatric and Allopatric Isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly Sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 Sheep in France." *Veterinary Parasitology*. 116(2):139–50. doi: 10.1016/S0304-4017(03)00259-0.
3. Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT. 2002. "Mechanisms of Immunity to *Haemonchus contortus* Infection in Sheep." *Parasite Immunology* 24(1):39–46. doi: 10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x.
4. Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT. 2000. "The Immunobiology of Gastrointestinal Nematode Infections in Ruminants." *Advances in Parasitology* 45:181–241.
5. Banco Mundial. 2009. "Minding the Stock: Bringing Public Policy to Bear on Livestock Sector Development." Report No. 44010-GIB (44010):1–92.
6. Bartley DJ, Hamer K, Andrews L, Sargison ND, Morrison AA. 2019. "Multigenic Resistance to Monepantel on a UK Sheep Farm." *Veterinary Parasitology: X* 1(October 2018):100003. doi: 10.1016/j.vpoa.2019.100003.
7. Bishop SC. 2012. "Possibilities to Breed for Resistance to Nematode Parasite Infections in Small Ruminants in Tropical Production Systems." *Animal* 6(5):741–47. doi: 10.1017/S1751731111000681.
8. Bisset SA, Morris CA. 1996. "Feasibility and Implications of Breeding Sheep for Resilience to Nematode Challenge." *International Journal for Parasitology* 26(8–9):857–68. doi: 10.1016/S0020-7519(96)80056-7.
9. Borchert A. 1975. *Parasitología Veterinaria*. 2a edición. Zaragoza: Ed. Acribia.
10. Bordes L, Dumont N, Lespine A, Souil E, Sutra JF, Prévot F, Grisez C, Romanos L, Dailedouze A, Jacquet P. 2020. "First Report of Multiple Resistance to Eprinomectin and Benzimidazole in *Haemonchus contortus* on a Dairy Goat Farm in France." *Parasitology International* 76:102063. doi: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102063>.
11. Bowman D. 2011. *Georgis's Parasitology for Veterinarians*. Vol. 1. 9a edición. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders Co.
12. Britton C, Emery DL, McNeilly TN, Nisbet AJ, Stear MJ. 2020. "The Potential for Vaccines against Scour Worms of Small Ruminants." *International Journal for Parasitology* 50(8):533–53. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.04.003.
13. van den Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. 2015. "*Haemonchus contortus* Resistance to Monepantel in Sheep." *Veterinary Parasitology* 209. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.026.
14. Charlier J, Morgan ER, Rinaldi L, van Dijk J, Demeler J, Höglund J, Hertzberg H, van Ranst B, Hendrickx G, Vercruysse J, Kenyon F. 2014. "Practices to Optimise Gastrointestinal Nematode Control on Sheep, Goat and Cattle Farms in Europe Using Targeted (Selective) Treatments." *Veterinary Record* 175(10):250–55. doi: 10.1136/vr.102512.
15. Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, Hoste H, Williams AR, Sotiraki S, Höglund J, Chartier C, Geldhof P, van Dijk J, Rinaldi L, Morgan ER, von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J, Claerebout E. 2018. "Mind the Gaps in Research on the Control of Gastrointestinal Nematodes of Farmed Ruminants and Pigs." *Transboundary and Emerging Diseases* 65(February 2017):217–34. doi: 10.1111/tbed.12707.
16. Chartier C, Etter E, Hoste H, Pors I, Mallereau MP, Broqua C, Mallet S, Koch C, Massé A. 2000. "Effects of the Initial Level of Milk Production and of the Dietary Protein Intake on the Course of Natural Nematode Infection in Dairy Goats." *Veterinary Parasitology* 92(1):1–13. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00268-5.
17. Claerebout E, Geldhof P. 2020. "Helminth Vaccines in Ruminants: From Development to Application." *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 36(1):159–71. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.10.001.
18. Colditz IG, Eisemann CH, Tellam RL, McClure SJ, Mortimer SI, Husband AJ. 1996. "Growth of *Lucilia Cuprina* Larvae Following Treatment of Sheep Divergently Selected for Fleece Rot and Fly Strike with Monoclonal Antibodies to T Lymphocyte Subsets and Interferon." *International Journal for Parasitology* 26(7):775–82. doi: 10.1016/0020-7519(96)00048-3.
19. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J. 2006. "The Detection of Anthelmintic Resistance in Nematodes of Veterinary Importance." *Veterinary Parasitology* 136(3–4):167–85. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.019.
20. Dey AR, Begum N, Anisuzzaman, Alim MA, Alam MZ. 2020. "Multiple Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants in Bangladesh." *Parasitology International* 77:102105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102105>.
21. van Dijk J, David GP, Baird G, Morgan ER. 2008. "Back to the Future: Developing Hypotheses on the Effects of Climate Change on Ovine Parasitic Gastroenteritis from Historical Data." *Veterinary Parasitology* 158(1–2):73–84. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.08.006.

22. van Dijk J, Sargison ND, Kenyon F, Skuce PJ. 2010. "Climate Change and Infectious Disease: Helminthological Challenges to Farmed Ruminants in Temperate Regions." *Animal* 4(3):377–92. doi: 10.1017/S1751731109990991.
23. Dominik S. 2005. "Quantitative Trait Loci for Internal Nematode Resistance in Sheep: A Review." *Genetics Selection Evolution* 37(SUPPL. 1):83–96. doi: 10.1051/gse:2004027.
24. Epe C, Holst C, Koopmann R, Schnieder T, Larsen M, Von Samson-Himmelstjerna G. 2009. "Experiences with *Duddingtonia flagrans* Administration to Parasitized Small Ruminants." *Veterinary Parasitology* 159(1):86–90. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.026.
25. Fairlie-Clarke K, Kaseja K, Sotomaior C, Brady N, Moore K, Stear MJ. 2019. "Salivary IgA: A Biomarker for Resistance to *Teladorsagia circumcincta* and a New Estimated Breeding Value." *Veterinary Parasitology* 269(December 2018):16–20. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.04.005.
26. FAO. 2007. *State of the Art in the Management of Animal Genetic Resources*.
27. FAO. 2002. "Biological Control of Nematode Parasites of Small Ruminants in Asia." *FAO Animal Production and Health Paper* 1–100.
28. Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M. 2015a. "Vaccination of Lambs with the Recombinant Protein RHc23 Elicits Significant Protection against *Haemonchus contortus* Challenge." *Veterinary Parasitology* 211(1–2):54–59. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.04.029.
29. Fawzi EM, González-Sánchez ME, Corral MJ, Alunda JM, Cuquerella M. 2015b. "Vaccination of Lambs with the Recombinant Protein RHc23 Elicits Significant Protection against *Haemonchus contortus* Challenge." *Veterinary Parasitology* 211(1–2):54–59. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.04.029.
30. Fox NJ, Smith LA, Houdijk JGM, Athanasiadou S, Hutchings MR. 2018. "Ubiquitous Parasites Drive a 33% Increase in Methane Yield from Livestock." *International Journal for Parasitology* 48(13):1017–21. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.06.001.
31. Fox N, Marion G, Davidson R, White P, Hutchings MR. 2012. "Livestock Helminths in a Changing Climate: Approaches and Restrictions to Meaningful Predictions." *Animals* 2:93–107. doi: 10.3390/ani2010093.
32. Gibson JP, Bishop SC. 2005. "Use of Molecular Markers to Enhance Resistance of Livestock to Disease: A Global Approach." *OIE Revue Scientifique et Technique* 24(1):343–53. doi: 10.20506/rst.24.1.1573.
33. Gómez-Rincón C, Uriarte J, Valderrábano J. 2006. "Efficiency of *Duddingtonia flagrans* against Trichostrongyle Infections of Sheep on Mountain Pastures." *Veterinary Parasitology* 141(1–2):84–90. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.007.
34. González JF, Hernández A, Meeusen ENT, Rodríguez F, Molina JM, Jaber JR, Raadsma HW, Piedrafita DM. 2011. "Fecundity in Adult *Haemonchus contortus* Parasites Is Correlated with Abomasal Tissue Eosinophils and  $\gamma\delta$  T Cells in Resistant Canaria Hair Breed Sheep." *Veterinary Parasitology* 178(3–4):286–92. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.005.
35. González JF, Hernández A, Molina JM, Fernández A, Raadsma HW, Meeusen ENT, Piedrafita DM. 2008. "Comparative Experimental *Haemonchus contortus* Infection of Two Sheep Breeds Native to the Canary Islands." *Veterinary Parasitology* 153(3–4):374–78. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.02.019.
36. Greer A. 2008. "Trade-Offs and Benefits: Implications of Promoting a Strong Immunity to Gastrointestinal Parasites in Sheep." *Parasite Immunology* 30:123–32. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.00998.x.
37. Gruner L, Aumont G, Terefe G, Brunel JC, Péry C, Cognié Y, Guérin Y. 2003. "Experimental Infection of Black Belly and INRA 401 Straight and Crossbred Sheep with Trichostrongyle Nematode Parasites." *Veterinary Parasitology* 116:239–49. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.07.005.
38. Guo Z, González JF, Hernandez JN, McNeilly TN, Corripio-Miyar Y, Frew D, Morrison T, Yu P, Li RW. 2016. "Possible Mechanisms of Host Resistance to *Haemonchus contortus* Infection in Sheep Breeds Native to the Canary Islands." *Scientific Reports* 6(April):1–14. doi: 10.1038/srep26200.
39. Hayward AD. 2013. "Causes and Consequences of Intra- and Inter-Host Heterogeneity in Defence against Nematodes." *Parasite Immunology* 35(11):362–73. doi: 10.1111/pim.12054.
40. Healey K, Lawlor C, Knox MR, Chambers M, Lamb J, Groves P. 2018. "Field Evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the Reduction of Worm Burden in Grazing Animals: Pasture Larval Studies in Horses, Cattle and Goats." *Veterinary Parasitology* 258(June 2017):124–32. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.06.017.
41. Henderson NG, Stear MJ. 2006. "Eosinophil and IgA Responses in Sheep Infected with *Teladorsagia circumcincta*." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112(1–2):62–66. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.03.012.
42. Hernández JN. 2015. "Interacción Parásito-Hospedador Entre Nematodos Gastrointestinales y Razas Ovinas Canarias. Papel de los Linfocitos  $\gamma\delta$  y los Eosinófilos." Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).
43. Herrera-Manzanilla FA, Ojeda-Robertos N, Garduño R, Cámara-Sarmiento R, Torres-Acosta F. 2017. "Gastrointestinal Nematode Populations with Multiple Anthelmintic Resistance in Sheep Farms from the Hot Humid Tropics of Mexico." *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 9. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.04.007.

44. Hoste H, Le Frileux Y, Pommaret A. 2002. "Comparison of Selective and Systematic Treatments to Control Nematode Infection of the Digestive Tract in Dairy Goats." *Veterinary Parasitology* 106(4):345–55. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00084-5.
45. Hoste H, Torres-Acosta JFJ. 2011. "Non Chemical Control of Helminths in Ruminants: Adapting Solutions for Changing Worms in a Changing World." *Veterinary Parasitology* 180(1–2):144–54. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.035.
46. Jackson F, Bartley DJ, Bartley Y, Kenyon F. 2009. "Worm Control in Sheep in the Future." *Small Ruminant Research* 86(1–3):40–45. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.09.015.
47. Jarrett WFH., Jennings FW, Mulligan W, McIntyre WIM, Sharp NCC, Urquhart GM. 1959. "Immunological Studies on *Dictyocaulus viviparus* Infection in Calves. Double Vaccination with Irradiated Larvae." *Am. J. Vet. Res.* 20:522–52.
48. Kaplan RM, Vidyashankar AN. 2012. "An Inconvenient Truth: Global Worming and Anthelmintic Resistance." *Veterinary Parasitology* 186(1–2):70–78. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.048.
49. Kearney PE, Murray PJ, Hoy JM, Hohenhaus M, Kotze A. 2016. "The 'Toolbox' of Strategies for Managing *Haemonchus contortus* in Goats: What's in and What's Out." *Veterinary Parasitology* 220:93–107. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.028.
50. Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruyse J, Jackson F. 2009. "The Role of Targeted Selective Treatments in the Development of Refugia-Based Approaches to the Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants." *Veterinary Parasitology* 164(1):3–11. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.04.015.
51. Kenyon F, Jackson F. 2012. "Targeted Flock/Herd and Individual Ruminant Treatment Approaches." *Veterinary Parasitology* 186(1–2):10–17. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.041.
52. Li Y, Miller JE, Franke DE. 2001. "Epidemiological Observations and Heterosis Analysis of Gastrointestinal Nematode Parasitism in Suffolk, Gulf Coast Native, and Crossbred Lambs." *Veterinary Parasitology* 98(4):273–83. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00440-X.
53. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. 2013. "Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling." *Journal of Pathology* 229(2):176–85. doi: 10.1002/path.4133.
54. Martínez-Valladares M. 2006. "Estudio Sobre la Infección por *Teladorsagia circumcincta* en Ovinos de Raza Churra: Criterios y Métodos para la Identificación de Animales Resistentes."
55. Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E. 2016. "Progress in the Development of Subunit Vaccines for Gastrointestinal Nematodes of Ruminants." *Parasite Immunology* 38(12):744–53. doi: 10.1111/pim.12391.
56. McIntyre J, Hamer K, Morrison AA, Bartley DJ, Sargison N, Devaney E, Laing R. 2018. "Hidden in Plain Sight - Multiple Resistant Species within a Strongyle Community." *Veterinary Parasitology* 258:79–87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.012>.
57. McMahan C, Gordon A, Edgar H, Hanna R, Brennan G, Fairweather I. 2012. "The Effects of Climate Change on Ovine Parasitic Gastroenteritis Determined Using Veterinary Surveillance and Meteorological Data for Northern Ireland over the Period 1999-2009." *Veterinary Parasitology* 190:167–77. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.016.
58. McManus C, Do Prado Paim T, Barros De Melo C, Brasil BSAF, Paiva SR. 2014. "Selection Methods for Resistance to and Tolerance of Helminths in Livestock." *Parasite* 21. doi: 10.1051/parasite/2014055.
59. McRae KM, Stear MJ, Good B, Keane OM. 2015. "The Host Immune Response to Gastrointestinal Nematode Infection in Sheep." *Parasite Immunology* 37(12):605–13. doi: 10.1111/pim.12290.
60. Meana A, Rojo-Vázquez FA. 1999. "Parasitosis de Los Rumiantes. Tricostongilidosis y Otras Nematodosis." P. 985 in *Parasitología Veterinaria, 1999 (Cordero del Campillo M. et al)*. McGraw-Hill Interamericana.
61. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA. 2021. "Ganadería. Razas Ganaderas (ARCA). Datos Generales de Raza Ovina Canaria de Pelo." Retrieved July 1, 2021 (<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/canaria-pelo/default.aspx>).
62. Molina JM, Gutiérrez AC, Rodríguez-Ponce E, Viera JA, Hernández S. 1997. "Abomasal Nematodes in Goats from the Subtropical Island of Grand Canary (Spain)." *Veterinary Research* 28(3):259–70. doi: 10.1016/S0928-4249(97)82009-3.
63. Moreno-Romieux C, Salle G, Jacquiet P, Blanchard A, Chylinsk C, Cabaret J, Francois D., Saccareau M., Astruc J. M., Bambou J. C., Mandonnet N. 2017. Genetic Resistance to Infections by Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants: A Sustainability Issue for Grass-based Production Systems. *Inra Prod Anim.* 30:47–56. doi: 10.20870/productions-animales.2017.30.1.2231
64. Morgan ER, van Dijk J. 2012. "Climate and the Epidemiology of Gastrointestinal Nematode Infections of Sheep in Europe." *Veterinary Parasitology* 189(1):8–14. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.028.
65. Mugambi JM., Bain RK, Wanyangu SW, Ihiga MA, Duncan JL, Murray N, Stear MJ. 1997. "Resistance of Four Sheep Breeds to Natural and Subsequent Artificial *Haemonchus contortus* Infection." *Veterinary Parasitology* 69(3–4):265–73. doi: 10.1016/S0304-4017(96)01128-4.

66. Nari A, Eddi C, Martins J, Benavides E. 2003. *Resistencia a Los Antiparasitarios: Estado Actual Con Énfasis En América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 157*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
67. Nisbet AJ, McNeilly TN, Greer AW, Bartley Y, Oliver EM, Smith S, Palarea-Albaladejo J, Matthews JB. 2016. "Protection of Ewes against *Teladorsagia circumcincta* Infection in the Periparturient Period by Vaccination with Recombinant Antigens." *Veterinary Parasitology* 228:130–36. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.002.
68. Nisbet AJ, McNeilly TN, Price DRG, Oliver EM, Bartley Y, Mitchell M, Palarea-Albaladejo J, Matthews JB. 2019. "The Rational Simplification of a Recombinant Cocktail Vaccine to Control the Parasitic Nematode *Teladorsagia circumcincta*." *International Journal for Parasitology* 49(3–4):257–65. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.10.006.
69. Nisbet AJ, McNeilly TN, Wildblood LA, Morrison AA, Bartley DJ, Bartley Y, Longhi C, McKendrick IJ, Palarea-Albaladejo J, Matthews JB. 2013. "Successful Immunization against a Parasitic Nematode by Vaccination with Recombinant Proteins." *Vaccine* 31(37):4017–23. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.026.
70. Nisbet AJ, Meeusen ETN, González JF, Piedrafito DM. 2016. "Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development." Pp. 353–96 in *Advances in Parasitology*. Vol. 93, edited by R. B. Gasser and G. V. B. T.-A. in P. Samson-Himmelstjerna. Academic Press.
71. O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. 2006. "Ecology of the Free-Living Stages of Major Trichostrongylid Parasites of Sheep." *Veterinary Parasitology* 142(1–2):1–15. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.035.
72. Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JFJ, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P. 2009. "Digestibility of *Duddingtonia flagrans* Chlamydospores in Ruminants: In Vitro and in Vivo Studies." *BMC Veterinary Research* 5(December). doi: 10.1186/1746-6148-5-46.
73. Piedrafito DM, Raadsma HW, Gonzalez JF, Meeusen ETN. 2010. "Increased Production through Parasite Control: Can Ancient Breeds of Sheep Teach Us New Lessons?" *Trends in Parasitology* 26(12):568–73. doi: 10.1016/j.pt.2010.08.002.
74. Rocha RA, Araújo JV, Amarante AFT. 2007. "Efficacy of the Nematode-Trapping Fungus *Duddingtonia flagrans* against Infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* Species in Lambs at Pasture." *Journal of Helminthology* 81(4):387–92. doi: 10.1017/S0022149X07853697.
75. Rose H, Caminade C, Bolajoko M-B, Phelan P, Dijk J, Baylis M, Williams D, Morgan E. 2016. "Climate-Driven Changes to the Spatio-Temporal Distribution of the Parasitic Nematode, *Haemonchus contortus*, in Sheep in Europe." *Global Change Biology* 22. doi: 10.1111/gcb.13132.
76. Rose H, Hoar B, Kutz SJ, Morgan ER. 2014. "Exploiting Parallels between Livestock and Wildlife: Predicting the Impact of Climate Change on Gastrointestinal Nematodes in Ruminants." *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3(2):209–19. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.01.001.
77. Ruiz-Huidobro C, Sagot L, Lugagne S, Huang Y, Milhes M, Bordes L, Prévot F, Grisez C, Gautier D, Valadier C, Sautier M, Jacquet P. 2019. "Cell Grazing and *Haemonchus contortus* Control in Sheep: Lessons from a Two-Year Study in Temperate Western Europe." *Scientific Reports* 9(1):1–9. doi: 10.1038/s41598-019-49034-y.
78. Sargison ND, Wilson DJ, Bartley D, Penny C, Jackson F. 2007. "Haemonchosis and Teladorsagiosis in a Scottish Sheep Flock Putatively Associated with the Overwintering of Hypobiotic Fourth Stage Larvae." *Veterinary Parasitology* 147:326–31. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.04.011.
79. Schallig HDFH. 2000. "Immunological Responses of Sheep to *Haemonchus contortus*." *Parasitology* 120(SUPPL). doi: 10.1017/s003118209900579x.
80. Skuce PJ, Morgan ER, van Dijk J, Mitchell M. 2013. "Animal Health Aspects of Adaptation to Climate Change: Beating the Heat and Parasites in a Warming Europe." *Animal : An International Journal of Animal Bioscience* 7 Suppl 2:333–45. doi: 10.1017/S175173111300075X.
81. Smith P, Martino D, Cai Z, Gwary D, Janzen H, Kumar P, McCarl B, Ogle S, O'Mara F, Rice C, Scholes B, Sirotenko O, Howden M, McAllister T, Pan G, Romanenkov V, Schneider U, Towprayoon S, Wattenbach M, Smith J. 2008. "Greenhouse Gas Mitigation in Agriculture." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1492):789–813. doi: 10.1098/rstb.2007.2184.
82. Soulsby J. 1987. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias En Los Animales Domésticos*.
83. Stear MJ, Bishop SC, Doligalska M, Duncan JL, Holmes PH, Irvine J, McCririe L, McKellar QA, Sinski E, Murray M. 1995. "Regulation of Egg Production, Worm Burden, Worm Length and Worm Fecundity by Host Responses in Sheep Infected with *Ostertagia circumcincta*." *Parasite Immunology* 17(12):643–52. doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb01010.x.
84. Stear MJ, Bishop SC, Henderson NG, Scott I. 2003. "A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*." *Anim Health Res Rev*. Jun;4(1):45-52. doi: 10.1079/ahrr200351.
85. Stear MJ, Doligalska M, Donskow-Schmelter K. 2007. "Alternatives to Anthelmintics for the Control of Nematodes in Livestock." *Parasitology* 134(2):139–51. doi: 10.1017/S0031182006001557.

86. Stear MJ, Murray M. 1994. "Genetic Resistance to Parasitic Disease: Particularly of Resistance in Ruminants to Gastrointestinal Nematodes." *Veterinary Parasitology* 54(1):161–76. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90089-2).
87. Stear MJ, Wakelin D. 1998. "Genetic Resistance to Parasitic Infection." *OIE Revue Scientifique et Technique* 17(1):143–53. doi: 10.20506/rst.17.1.1089.
88. Stear MJ, Piedrafito DM, Sloan S, Alenizi D, Cairns C, Jenvey C. 2019. "*Teladorsagia circumcincta*." *WikiJournal of Science* 2:4. doi: 10.15347/WJS/2019.004.
89. Steinfeld H, Gerber P. 2006. "Livestock's Role in Climate Change and Air Pollution." *Livestock's Long Shadow. Environmental Issues and Options* 79–123.
90. Strain SAJ, Bishop SC, Henderson NG, Kerr A, McKellar QA, Mitchell S, Stear MJ. 2002. "The Genetic Control of IgA Activity against *Teladorsagia circumcincta* and Its Association with Parasite Resistance in Naturally Infected Sheep." *Parasitology* 124(5):545–52. doi: 10.1017/S0031182002001531.
91. Thornton PK. 2010. "Livestock Production: Recent Trends, Future Prospects." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1554):2853–67. doi: 10.1098/rstb.2010.0134.
92. Tizard I. 2009. *Introducción a La Inmunología Veterinaria*. 8a edición. Barcelona: Ed. Elsevier España SL.
93. Torres-Acosta JFJ, Hoste H. 2008. "Alternative or Improved Methods to Limit Gastro-Intestinal Parasitism in Grazing Sheep and Goats." *Small Ruminant Research* 77(2–3):159–73. doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.03.009.
94. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. 1996. *Veterinary Parasitology*. 2a edición. Blackwell Publishing Ltd.
95. Vagenas D, Jackson F, Russel AJF, Merchant M, Wright IA, Bishop SC. 2002. "Genetic Control of Resistance to Gastro-Intestinal Parasites in Crossbred Cashmere-Producing Goats: Responses to Selection, Genetic Parameters and Relationships with Production Traits." *Animal Science* 74(2):199–208. doi: 10.1017/S135772980005236X.
96. Venturina VM, Gossner AG, Hopkins J. 2013. "The Immunology and Genetics of Resistance of Sheep to *Teladorsagia circumcincta*." *Veterinary Research Communications* 37(2):171–81. doi: 10.1007/s11259-013-9559-9.
97. Verducruysse J, Charlier J, van Dijk J, Morgan ER, Geary T, Von Samson-Himmelstjerna G, Claerebout E. 2018. "Control of Helminth Ruminant Infections by 2030." *Parasitology* 145(13):1655–64. doi: 10.1017/S003118201700227X.
98. Waller PJ, Rudby-Martin L, Ljungström BL, Rydzik A. 2004. "The Epidemiology of Abomasal Nematodes of Sheep in Sweden, with Particular Reference to over-Winter Survival Strategies." *Veterinary Parasitology* 122(3):207–20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.04.007>.
99. van Wyk JA, Hoste H, Kaplan RM, Besier RB. 2006. "Targeted Selective Treatment for Worm Management-How Do We Sell Rational Programs to Farmers?" *Veterinary Parasitology* 139(4):336–46. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.023.
100. van Wyk JA, Mayhew E. 2013. "Morphological Identification of Parasitic Nematode Infective Larvae of Small Ruminants and Cattle: A Practical Lab Guide." *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 80(1):1–14. doi: 10.4102/ojvr.v80i1.539.

---

Cynthia Machin Pérez  
cynthia.machin@ulpgc.es

**Título de la revisión:** Lucha contra los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes: desafíos y métodos de control.  
**Título de la Tesis:** "Immune response of Canaria Hair Breed and Canaria Sheep vaccinated against *Teladorsagia circumcincta*".  
**Directores:** Jorge Fco. González Pérez y Julia N. Hernández Vega.  
**Tutora:** Noemí Castro Navarro.  
**Centro de trabajo:** Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) – Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).  
**Centro de realización y presentación:** Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).  
**Fecha de lectura:** 28 de enero de 2022.

**Samantha Moratal Martínez**

# A REVIEW OF EMERGING ZOO NOTIC PARASITES IN MARINE FISH

## INTRODUCTION

### 1. OVERVIEW ON MARINE FISH CONSUMPTION

- 1.1. CONSUMPTION OF AQUATIC PRODUCTS
- 1.2. ORIGIN OF EDIBLE MARINE-FISH FOR HUMAN CONSUMPTION
  - 1.2.1 Capture fisheries
  - 1.2.2 Marine finfish aquaculture
- 1.3. BENEFITS AND RISKS FROM FISH CONSUMPTION

### 2. EMERGING MARINE FISHBORNE PARASITIC ZOO NOSES

- 2.1. THE CONCEPT OF EMERGING PARASITIC ZOO NOSES
- 2.2. DIVERSITY OF EMERGING MARINE FISHBORNE PARASITES
  - 2.2.1 Trematodes
  - 2.2.2 Cestodes
  - 2.2.3 Nematodes
- 2.3. ANISAKIS SPP.
  - 2.3.1 Life cycle
  - 2.3.2 Epidemiology
  - 2.3.3 Anisakiosis
  - 2.3.4 Prevention and control
  - 2.3.5 Current state of research and future directions

### 3. MARINE FISH AS CARRIERS OF EMERGING WATERBORNE UNICELLULAR PARASITES

- 1.1. EMERGING WATERBORNE UNICELLULAR PARASITES
- 1.2. PRESENCE IN MARINE ENVIRONMENT
- 1.3. POTENTIAL ROLE OF MARINE FISH IN TRANSMISSION

### 4. REFERENCES

# A review of emerging zoonotic parasites in marine fish

## Introducción

---

In an ever-evolving world with a burgeoning global population, the consumption of fish has emerged as a critical focal point within the realm of nutrition, food security, and environmental sustainability. However, fish is not without its risks. This thesis delves into emerging zoonotic parasites in Mediterranean edible marine fish. We are going to start by introducing some data on fish consumption and production, to continue with emerging zoonotic parasites specific to fish hosts, and finally, to document the potential presence of other waterborne zoonotic parasites in marine fish hosts. Note that data provided in the following subsections on fish consumption and production refer primarily to the years 2019 and 2020. This corresponds to the most recent public updates available from the Food and Agriculture Organization (FAO).

# 1 OVERVIEW ON MARINE FISH CONSUMPTION

## 1.1. CONSUMPTION OF AQUATIC PRODUCTS

Global consumption of aquatic food has increased at a mean annual rate of 3.0% in the last six decades, which means that we are now consuming five times more aquatic food than 60 years ago. This increase has been produced in parallel to the population growth (mean annual rate of 1.6%), but also because of an increase in per capita consumption, from 9.9 kg in the 1960s to 20.5 kg in 2019. However, per capita consumption is widely variable according to the region/country and is highly influenced by aquatic food availability, income status, or food habits. It is noteworthy that the per capita consumption annual growth rate is the highest in upper-middle-income countries, with the notable leadership of China (3.2%), compared to lower-middle-income countries (1.9%) or high-income countries (0.5%; high consumption already in previous decades). Finally, low-income countries are experiencing a 0.2% decrease through the years (Figure 1). Despite this, in several low-income countries with high levels of undernutrition, aquatic food protein contributes to a greater extent to the total animal protein intake, being a key factor in food security (FAO, 2022a).

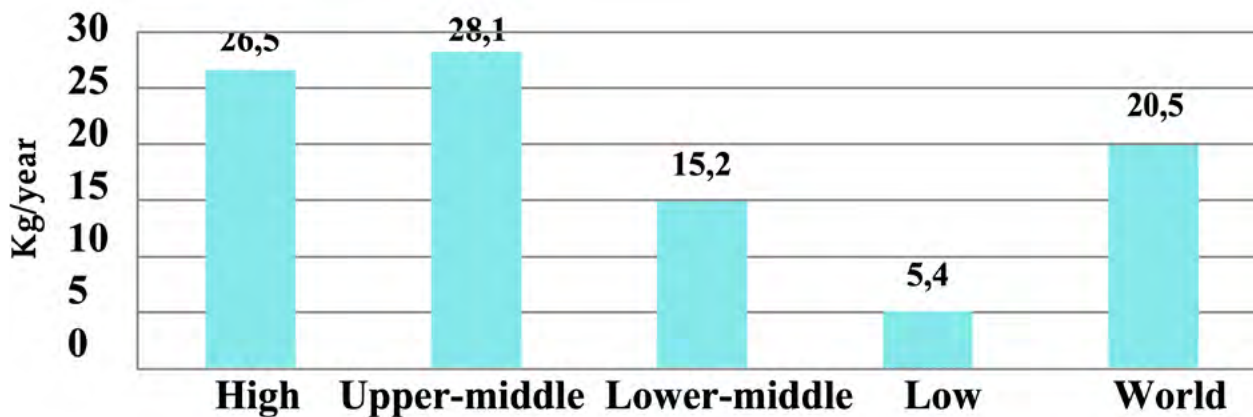


Figure 1. Aquatic food consumption (per capita consumption in kg/year) according to country income status. Year 2019. Adapted from FAO (2022a).

If considering the most recent available data (year 2019), from the total per capita intake, 75% came from finfish, the rest being shellfish. In turn, marine finfish accounted for the 33% (FAO, 2022a). It is worth mentioning the high rate of seafood consumption in the European Mediterranean countries, 30.86 kg per capita, compared to the global average of 20.5 kg in 2019. Interestingly, the leadership is held by Portugal (59.9 kg per capita) and Spain (46 kg per capita) (European Commission, Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries, 2022; FAO, 2022a).

## 1.2. ORIGIN OF EDIBLE MARINE-FISH FOR HUMAN CONSUMPTION

Seafood for human consumption is provided by capture fisheries production and aquaculture production. In the last decades, the increasing demand for seafood products has been possible to cover because of significant growth in the aquaculture sector, rather than capture fisheries, with stagnant productions (Carvalho and Guillen, 2021).

Interestingly, marine fish is the only group in which most production still comes from capture fisheries, with less than 10% coming from aquaculture. This is in contrast with other aquatic food groups (freshwater and diadromous fishes, crustaceans, molluscs, and others) whereby aquaculture production far exceeds capture fisheries production (FAO, 2022a).

### 1.2.1. Capture fisheries

After an increasing trend from the 1950s to the late 1980s, capture fisheries production has been maintained relatively stable, with interannual fluctuations (86-93 million tonnes per year on average). From those, catch in marine waters represented 87.3% in the 2018-2020 period (FAO, 2022a) (Figure 2).

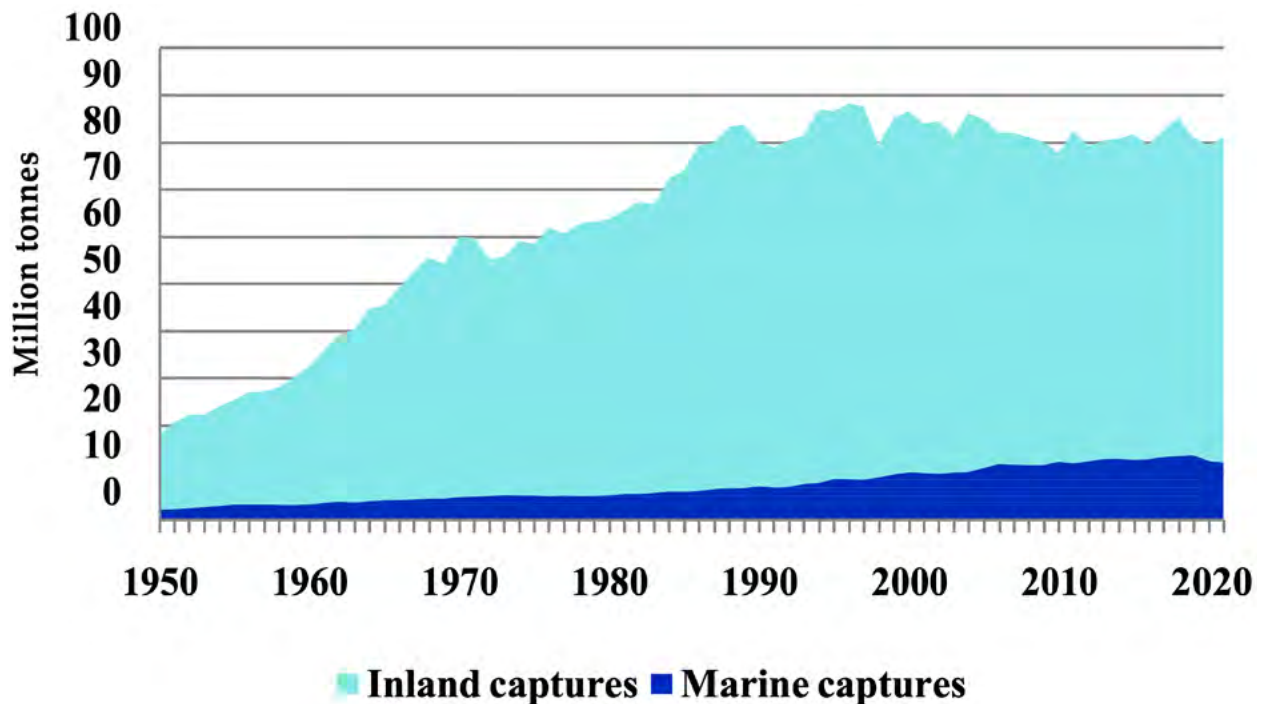


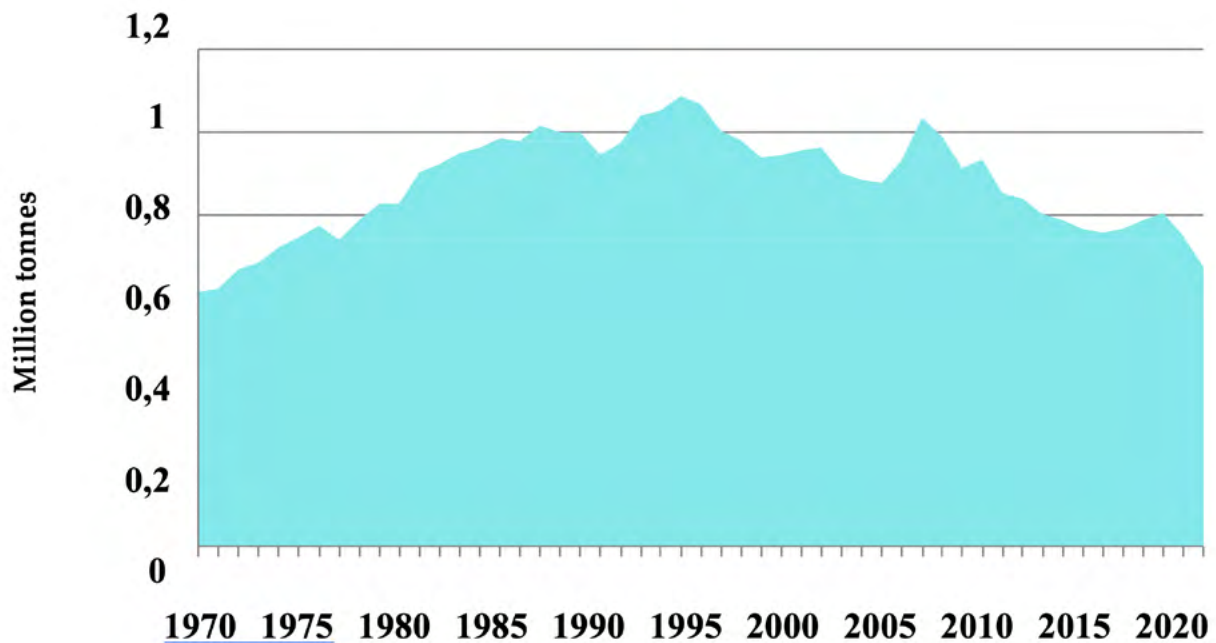
Figure 2. Temporal trends in global captures. Drawn from: FAO. Global capture production Quantity (1950-2021). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Extracted from: [https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/capture/capture\\_quantity](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/capture/capture_quantity). Data of Access: 19-07-2023.

Marine capture fisheries are dominated by a few producers, with the leading seven producers (China, Indonesia, Peru, the Russian Federation, the United States of America, India, and Vietnam) concentrating more than 50% of the captures (FAO, 2022a). The anchoveta (*Engraulis ringens*) heads the world marine finfish production, followed by the Alaska pollock (*Gadus chalcogrammus*) and the Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (FAO, 2022a).

In contrast with the global stability in captures, the percentage of fishery stocks within biologically sustainable levels has decreased from 90% in 1974 to 64.6% in 2019, which means that at the present time, more than 35% of the stocks are overfished. Among FAO's major fishing areas, the Southeast Pacific (division 87) and the Mediterranean and Black Sea (division 37) have the largest proportions of stocks being fished under unsustainable levels (66.7 and 63.4%, respectively) (FAO, 2022a).

“ Marine capture fisheries are dominated by a few producers, with the leading seven producers concentrating more than 50% of the captures (FAO, 2022a). ”

In the Mediterranean Sea, capture fisheries production increased from 1970 until 1994, reaching a maximum of 1,087,100 tonnes. Since then, the production has gone irregularly declining, with the highest drop registered in 2020 (674,500 tonnes), probably stressed by COVID-19 restrictions (FAO, 2022b) (Figure 3).



**Figure 3.** Temporal trends in Mediterranean captures. Drawn from: FAO. GFCM (Mediterranean and Black Sea) capture production Quantity (1970 - 2021). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Extracted from: [https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/gfcm\\_capture/gfcm\\_capture\\_quantity](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/gfcm_capture/gfcm_capture_quantity). Data of Access: 19-07-2023.

Based on last records (2018-2020 average), Italy is the main producer (20.9%) in the Mediterranean basin, followed by Tunisia (12.9%), Algeria (12.8%), Greece (9.9%), and Spain (9.5%). The small pelagic species, mainly herrings, sardines, and anchovies, contribute for slightly more than half of the total landings (FAO, 2022b).

Considering the General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) subregions, the western Mediterranean is the most productive subregion (20.3% of total Mediterranean landings), with Algeria being the main producer (39.5%), followed by Spain (29.2%) and Italy (16.3%). Small pelagic species, mainly pilchard (*Sardina pilchardus*), European anchovy (*Engraulis encrasicolus*), and sardinellas (*Sardinella* spp.) are again the main caught species (FAO, 2022b).

“ Considering the General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) subregions, the western Mediterranean is the most productive subregion (20.3% of total Mediterranean landings), with Algeria being the main producer (39.5%), followed by Spain (29.2%) and Italy (16.3%). ”

### 1.2.2. Marine finfish aquaculture

Due to capture fisheries stagnation, aquaculture production has led the growth of total seafood production since the 1980s. Farmed finfish have represented the largest proportion of aquaculture production for decades (excluding algae). In particular, of the total 122.6 million tonnes of aquaculture production in 2020, 57.5 million tonnes were farmed finfish, and from these, 8.3 million tonnes were from mariculture and coastal aquaculture (Figure 4). The Atlantic salmon (*Salmo salar*), followed by the milkfish (*Chanos chanos*), stands out among the overall mariculture and coastal finfish species produced globally. They account for 32.6% and 14%, respectively, of the total production within this group in 2020 (FAO, 2022a).

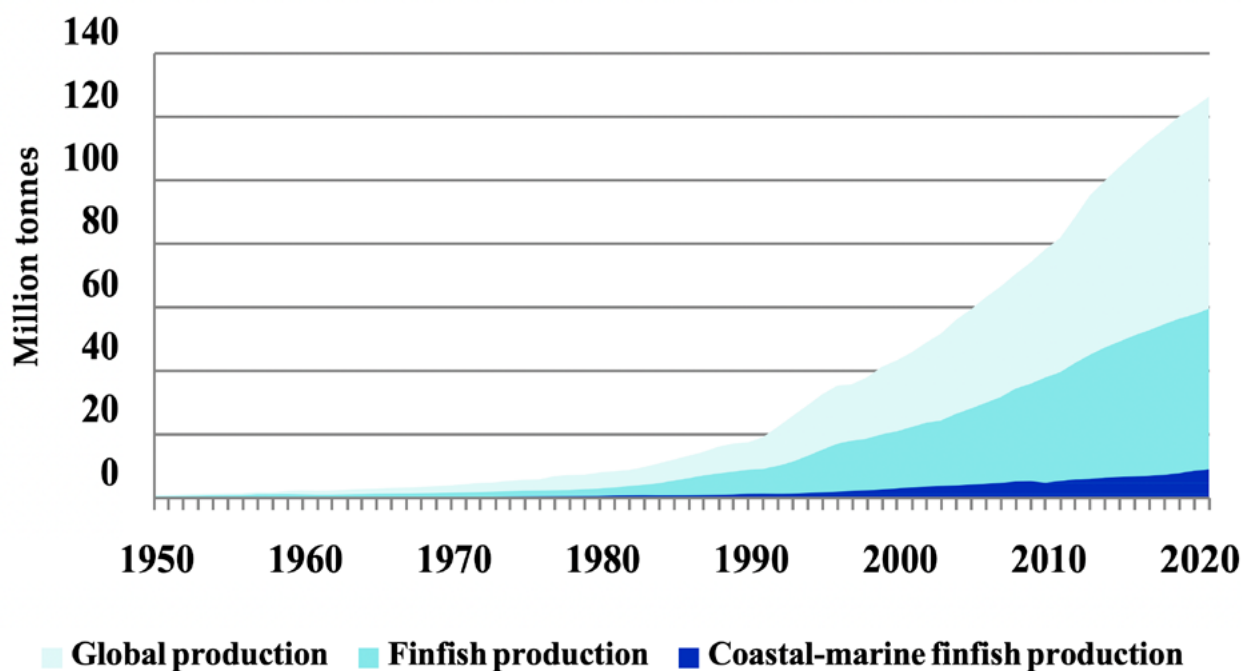


Figure 4. Temporal trends in world aquaculture production. Drawn from: FAO. Global aquaculture production Quantity (1950 - 2021). License: CC BY- NC-SA 3.0 IGO. Extracted from: [https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture\\_quantity](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_quantity). Data of Access: 19-07-2023.

Finfish mariculture and coastal aquaculture are led by Asia, with Europe in the second position. In Europe, two types of regions/productions can be considered: the predominant marine cold water production (northern Europe, mainly Norway), dominated by the Atlantic salmon, and the marine Mediterranean production, mastered by the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and the gilthead seabream (*Sparus aurata*). The main producing countries in the Mediterranean are Turkey, Greece, and Spain (FEAP, 2022).

Although the general situation is that most of the marine fish still comes from capture fisheries, the situation in the Mediterranean basin is different. In the Mediterranean, capture fisheries are still predominant, but aquaculture production has experienced a 15% increase in the last ten years, reaching 43% of the total Mediterranean production in 2019 (Carvalho and Guillen, 2021).

“ In the Mediterranean, capture fisheries are still predominant, but aquaculture production has experienced a 15% increase in the last ten years, ”

### 1.3. BENEFITS AND RISKS FROM FISH CONSUMPTION

Fish are an important source of high-quality protein. This fact is especially relevant in low-income countries, where aquatic food protein is the main source of animal protein, therefore having an important role in food security (FAO, 2022a). Indeed, The Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations include food security as a priority, as well as marine resources conservation and sustainability, as stated in SDGs 2 and 14: ‘End hunger, achieve food security and improved nutrition and promote sustainable agriculture’, and ‘Conserve and sustainably use the oceans, seas and marine resources’, respectively. Fisheries and aquaculture have been only explicitly, but superficially mentioned, in these both goals. However, several authors pointed out that fish, and especially aquaculture, could constitute a key factor in achieving the overall 17 SDGs, including those that are directly related, such as SDG 2 and 14, but also others with indirect or associate relationships (Troell et al., 2023).

Beyond that, fish consumption has several nutritional benefits and impacts positively on human health. Fish is rich in several essential nutrients, including n-3 polyunsaturated fatty acids, vitamins (especially A, B, and D), essential amino acids, and minerals, that are known to have interesting properties for human health, like anti-inflammatory, anti-carcinogenic or antioxidant activity (Chen et al., 2022). The synergistic effect of these activities, among several others, is thought to be behind the protective associations found between fish consumption and several health outcomes. Particularly, fish consumption has been linked to a reduced risk of mortality; it also decreases the risk of several cancers (brain, hepatocellular, and lung cancer, among others), cardiovascular and ischemic diseases (acute coronary syndrome, cerebrovascular disease or stroke), cognitive diseases (like depression or dementia risk), and even allergic condition (Zhao et al., 2023). Therefore, fish have an important role as part of a healthy diet, with a recommended intake of at least two servings ( $\approx 240$  g) per week, including one portion of oily fish (Piepoli et al., 2016).

However, eating fish, and seafood in general, can also pose health risks for consumers. Fish are a source of exposure to different chemical pollutants that they bioaccumulate from the environment or through food, including toxic metals and organic compounds (like polychlorinated biphenyls or organochlorine pesticides, among others), with known harmful effects on human health (Perelló et al., 2015; González et al., 2019). Moreover, fish also carry a plethora of biological agents, including viruses, bacteria, and parasites, that are responsible of foodborne diseases worldwide (Ziarati et al., 2022).

“Therefore, fish have an important role as part of a healthy diet, with a recommended intake of at least two servings ( $\approx 240$  g) per week, including one portion of oily fish (Piepoli et al., 2016).”

Due to the remarkable importance that fish has in worldwide diets, the assessment of the associated risks must be mandatory in both legislative and scientific fields. Hereafter, we focus on emerging parasites responsible for fishborne diseases.

“Moreover, fish also carry a plethora of biological agents, including viruses, bacteria, and parasites, that are responsible of foodborne diseases worldwide (Ziarati et al., 2022).”

## 2 EMERGING MARINE FISHBORNE PARASITIC ZOOSES

### 2.1. THE CONCEPT OF EMERGING PARASITIC ZOOSES

According to the World Health Organization (WHO), emerging and re-emerging infectious diseases (EIDs) concepts refer to a group of diseases that have originated in recent years or that have already existed for a long time but are experiencing rapid increase in incidence or changing their geographic distribution. In several cases, EIDs are zoonotic, therefore transmitted from animals to humans through direct contact or by food, water, or environment, including vector-borne diseases.

The emergence of the infectious agents involved in EIDs is driven by different factors that either involve greater contact between people and unusual pathogens or their natural hosts or foster their dissemination. These emergence drivers are usually linked to anthropogenic factors, although they can sometimes be due to natural causes, and can be classified as follows (adapted from Church, 2004; McArthur, 2019):

- Microbial adaptation, including the development of resistance to drugs, especially antibiotic resistance, or viruses' antigenic shifts.
- Ecological changes, mainly related to changes in the use of land and to climate change. Different human practices concerning land use, e.g., urbanization, deforestation, agricultural practices, construction of dams, etc., ultimately lead to close contact between humans and animals or arthropod- vectors, increasing the risk of exposure to infectious agents. On the other hand, climate change can impact the geographic distribution of hosts, but mainly arthropod-vectors, contributing to expanding their spatial ranges.
- Human demography: population growth and increased density of the human population, together with demographic movements (migration to urban areas, immigration) contribute to increasing the probability of getting in contact with new pathogens and/or facilitating their spreading.
- Technology, healthcare, and susceptibility to infection: especially in industrialized countries, technology has led to aging populations, sometimes suffering from chronic diseases. These population groups usually have impaired immune systems, making them more susceptible to infections.
- Breakdown in public health measures: conversely to industrialised countries, in developing countries, immunocompetence is hampered by malnutrition and the absence of immunization practice. Moreover, the lack of public health infrastructure, the lack of access to safe water, and, in general, the poor sanitary conditions, enhance the probability of contact with pathogens.
- International travel and global trade, which enables people and animals, but also food products and other goods, to travel quickly around the world and therefore, to facilitate the spread of pathogens and their vectors.

Agents involved in zoonotic EIDs are bacteria, viruses, parasites, and fungi. However, the utmost attention and recognition is received by viruses and bacterial diseases. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), lists the emerging infectious diseases/pathogens in three priority categories, according to their public health risk. Curiously, parasites received only one mention, corresponding to food and waterborne protozoa, in Category B. Also Microsporidia are listed in Category B; although they are currently classified as fungi (Adl et al., 2019), they are generally considered parasitic fungi. Two other parasites are listed as, *Additional emerging infectious diseases/pathogens*, namely acanthamebiasis and atypical *Babesia* (NIAID, 2018).

Traditionally, parasitic diseases had been related to poverty and considered to affect only underdeveloped and developing countries with low incomes (Chai et al., 2005). Therefore, little effort and resources have been invested in their study, concerning surveillance, prevention, and treatment. Paradoxically, the absence of good data on how these diseases impact health and economics makes it difficult to obtain more attention and resources. This state of neglect, together with the factors listed above, had provided a unique opportunity for several parasitic diseases to (re)emerge (Shamsi, 2019).

## 2.2. DIVERSITY OF EMERGING MARINE FISHBORNE PARASITES

Within fish, the situation is even worse, with zoonotic parasites from fish receiving little attention compared to other well-known zoonotic parasitosis (Chai et al., 2005). Despite the high frequencies of zoonotic parasites detected in fish, especially in wild-caught fish, human infection cases are miss-recognized and totally underdiagnosed (Shamsi, 2020). Among parasites, foodborne helminth parasites are those of great concern. While some of them are rare, others are known to cause severe illness and to represent a high risk to public health. This risk has increased in parallel to the rise in fish production, especially aquaculture, and the increment in seafood consumption. Moreover, changes in dietary habits, with growing interest in western countries in raw and undercooked fish dishes (sushi, sashimi, ceviche, etc.), together with climate change and the growth of international trading of fish and fish products, among other factors, have led to the emergence of several fishborne parasitic diseases (Lima dos Santos and Howgate, 2011; Fiorenza et al., 2020).

There are three major groups of zoonotic parasites infecting freshwater, brackish, or marine fish: trematodes, nematodes, and cestodes (Chai et al., 2005). People get infected by the consumption of raw or undercooked fish or fish products. Fishborne parasites have been reported worldwide, although their prevalence is notably high in Asian countries (Cong and Elsheikha, 2021), where the total and per capita aquatic food consumption are the highest worldwide (FAO, 2022a) and raw fish dishes are typically consumed.

### 2.2.1. Trematodes

Trematodes, commonly known as flukes, are the most diverse group of fishborne parasites and are considered emerging infectious pathogens (Ziarati et al., 2022). They are classified into three groups: liver, intestinal, and lung flukes. The general life cycle involves a definitive host (man or other piscivorous animals) and two intermediate hosts, a snail and a fish. The definitive host harbors the adult trematodes and sheds the embryonated eggs in feces. The eggs containing the miracidium may be directly ingested by a snail -the first intermediate host- or alternatively, the eggs may hatch and release the miracidium, which then penetrates the snail. After developing, the motile cercaria are released into the water, and subsequently, they find and penetrate the muscle of the second intermediate host, the fish, where they then develop into the infective stage, the metacercariae. Finally, the definitive host acquires the infection when they ingest infected raw or undercooked fish (Klimpel et al., 2019).

Liver flukes, belonging to the family Opistorchiidae, are among the most prevalent trematodes in humans, being endemic in southern Asia. They are known to cause severe diseases, and even some of them are considered to be carcinogenic (IARC, 2012). It is noteworthy that about 45 million people are currently infected by liver trematodes, with more than 680 million at risk of infection (Saijuntha et al., 2021). However, they are only transmitted by freshwater fishes and therefore are out of the scope of this research. Similarly, pulmonary paragonimiasis (genus *Paragonimus*) is exclusively transmitted by freshwater crabs and crayfish (Shamsi, 2019).

Intestinal flukes are a diverse group with at least 74 zoonotic species worldwide distributed, highlighting heterophyids (Heterophyidae) and echinostomes (Echinostomatidae). It is estimated that around 40-50 million people are infected worldwide (Chai et al., 2009). Clinical manifestations are generally related to the gastrointestinal system, being more severe in echinostomes than in heterophyids infections. Intestinal flukes have life cycles occurring mainly in freshwater, but also in brackish water hosts (Chai and Jung, 2020).

### 2.2.2. Cestodes

Fish tapeworms (class Cestoda) belonging to Diphyllbothriidea family are the causative agents of human diphyllbothriosis (and diplogonoporosis). There are about 15 species reported to infect humans (Scholz and Kuchta, 2016), although only four of them have been studied in detail and are responsible for the majority of human cases, namely *Diphyllbothrium latum*, *Diphyllbothrium nihonkaiense*, *Diphyllbothrium dendriticum*, and *Adenocephalus pacificus* (Scholz et al., 2009; Kuchta et al., 2015a). Clinical signs of diphyllbothriosis are usually mild and not life-threatening, therefore arousing little attention. This fact, together with a better understanding of the different species distribution enabled by molecular tools, has set up conditions for the disease (re)emergence (Scholz and Kuchta, 2016).

*D. latum* and *D. nihonkaiense* are the first and second most-frequent fishborne tapeworms, with a total of 10 to 20 million estimated global cases and more than 2,000, respectively. Both, together with *D. dendriticum* ( $\approx$  1,000 cases) are freshwater species, with freshwater fish and salmonids as second intermediate hosts (reviewed in Scholz and Kuchta, 2016). The knowledge of fish tapeworms' life cycle relies mostly on the well-studied, freshwater species. For marine species, marine mammals are known to be the definitive hosts; therefore it is assumed that marine copepods serve as the first intermediate hosts and marine fishes as the second intermediate hosts (Kuchta et al., 2015b). Humans get the infection when they eat raw or underprocessed fish or fish products that harbor the infective plerocercoids.

“ For marine species, marine mammals are known to be the definitive hosts; therefore it is assumed that marine copepods serve as the first intermediate hosts and marine fishes as the second intermediate hosts (Kuchta et al., 2015b). ”

Among marine tapeworms, *A. pacificus* and *Diplogonoporus balanopterae* must be highlighted because of their importance in public health. *A. pacificus* (formerly known as *Diphyllbothrium pacificum*) is a parasite of otariids (fur seals and sea lions), of which twelve families of marine fish are known to be second intermediate hosts (Scholz and Kuchta, 2016). It has been reported from humans (and also dogs) who feed on raw or undercooked marine fish (Kuchta et al., 2015b), with approximately 1,000 cases in the last seven decades (Kuchta et al., 2015a). It is widely distributed in its host type, the otariids (Hernández-Orts et al., 2015), but human cases are mostly reported from the Pacific coast of South America, with special mention to Peru. However, five recent cases detected in Spain, focus on its potential expansion probably linked to international trading of marine fresh fish (transported on ice) from endemic areas (Kuchta et al., 2014; Pastor-Valle et al., 2014). *D. balanopterae*, the causative agent of the diplogonoporosis, is another cosmopolitan marine fish tapeworm, from different whale species. Japanese anchovy (*Engraulis japonica*), Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*), and skip-jack tuna (*Katsuwonus pelamis*) are the recognized second intermediate hosts (Kino et al., 2002; Kuchta et al., 2015b). Around 300 cases of human infection have been recorded, the vast majority from Japan (Scholz and Kuchta, 2016). It is remarkable that four out of six cases diagnosed out of Japan were from Spain (Clavel et al., 1997; Pastor-Valle et al., 2014).

“ Around 300 cases of human infection have been recorded, the vast majority from Japan. It is remarkable that four out of six cases diagnosed out of Japan were from Spain. ”

### 2.2.3. Nematodes

Few fish nematodes are considered to cause emerging zoonoses; those that pose a risk to human health are anisakids (Anisakidae family) and members of Gnathostomatidae (*Gnathostoma* and *Echincephalus* genera).

The latter, just briefly mentioned, caused the so-called gnathostomiasis, linked to the consumption of raw or undercooked brackish or freshwater fish and amphibians and mainly reported in Southeast Asia, Central and South America (Herman and Chiodini, 2009). It produces allergic reactions and clinical disease that presents with nausea, vomiting, and abdominal pain. Larval subcutaneous migration produces inflammatory swelling (cutaneous disease) and may result in the penetration of other tissues and viscera (visceral disease) with more severe pathology; although rare, even the affection of the nervous system can occur, being fatal (Herman and Chiodini, 2009).

“From those, members of the genera *Anisakis*, *Contracaecum*, and *Pseudoterranova*, included species that are zoonotic, causing the disease known as anisakidosis (Ángeles-Hernández et al., 2020).”

“Larval subcutaneous migration produces inflammatory swelling (cutaneous disease) and may result in the penetration of other tissues and viscera (visceral disease) with more severe pathology;”

Family Anisakidae (Nematoda, Rhabditida) comprises eight parasitic genera of marine nematodes: *Anisakis* spp., *Contracaecum* spp., *Mawsonascaris* spp., *Phocascaris* spp., *Pseudoterranova* spp., *Pulchrascaris* spp., *Terranova* spp., and *Sulcascaris* spp. From those, members of the genera *Anisakis*, *Contracaecum*, and *Pseudoterranova*, included species that are zoonotic, causing the disease known as anisakidosis (Ángeles-Hernández et al., 2020). The specific term anisakiosis refers to the pathology caused only by members of *Anisakis* genus, mainly *Anisakis simplex* sensu lato (s.l.), which comprises, *Anisakis simplex* sensu stricto (s.s.) and *Anisakis pegreffii*, and, very rarely, *Anisakis physeteris*. These species are responsible for the vast majority of clinical cases caused by anisakids (Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020).

*Anisakis* spp., and anisakiosis, are explained in depth in the upcoming specific section for the following reasons, according to this thesis topic: (1) are cosmopolite parasites, with worldwide distribution; (2) it is the only marine fishborne parasite genus that includes species present in the Mediterranean basin, with autochthonous human cases in Mediterranean countries; and (3) it is considered to be an emerging disease of great concern worldwide among those transmitted through fish consumption (Mattiucci et al., 2013; Ángeles-Hernández et al., 2020).

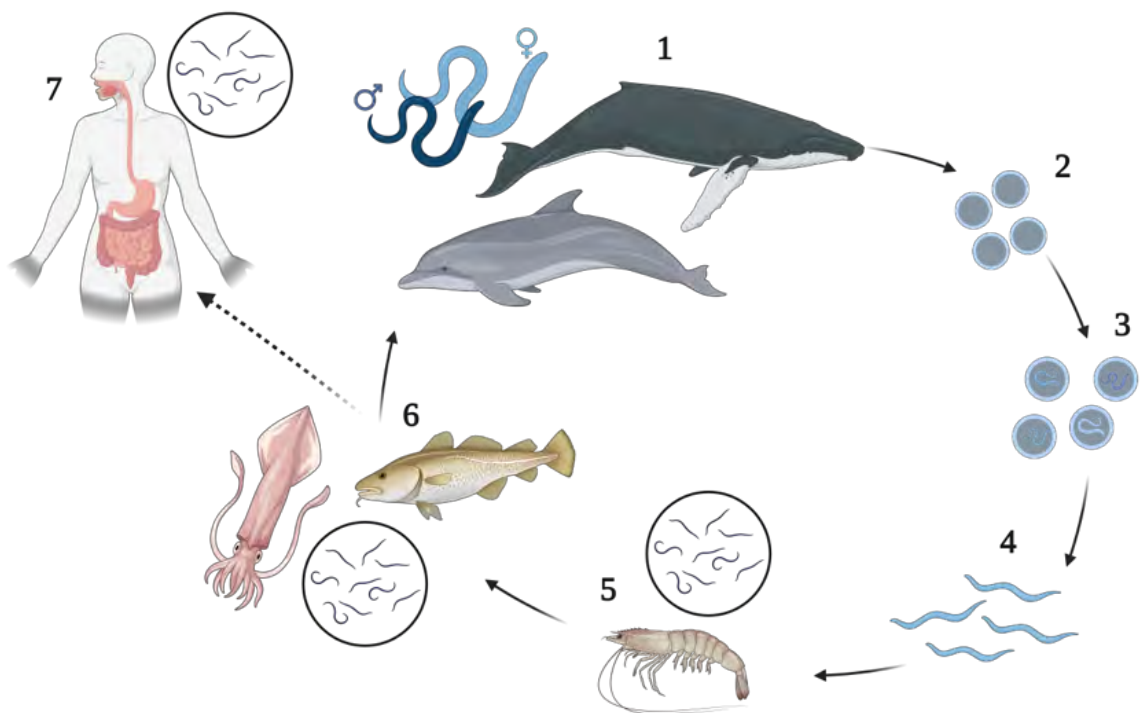
## 2.3. ANISAKIS SPP.

### 2.3.1. Life cycle

*Anisakis* spp. has a complex life cycle, involving several hosts. Reproductive adults are located in the gastric chambers of marine mammals (Ángeles-Hernández et al., 2020). Eggs are eliminated with feces into the seawater, where they embryonate. Some authors consider that the stage which emerges from the egg is the second- stage larva (L2), while others consider it is already the third-stage larva (L3) still maintaining the L2 sheath (Køie et al., 1995; Mladineo et al., 2023). These free-swimming larvae are ingested by the first intermediate host, mainly euphausiids, pass through their digestive system, lose the L2 sheath and establish in the coelom cavity. Here, L3 larvae grow until reaching the infective size (Aibinu et al., 2019). The second intermediate host, generally considered a paratenic host, is fish or squid that prey on these infected euphausiids. Here, larvae are thought to be in paratenesis (Trumbić et al., 2021) until reaching the definitive host. Marine mammals acquire the infection when feeding on these paratenic hosts. Finally, in the definitive host, the L3 experiments two moults until reaching the adult stage (Aibinu et al., 2019). Accidental transmission to humans occurs when eating raw or undercooked seafood (Ahmed et al., 2016) (Figure 5).

### 2.3.2. Epidemiology

As stated above, the majority of diagnosed cases are caused by sibling species of the *A. simplex* s.l. complex, i.e., *A. simplex* and *A. pregreffii*. However, most of the clinical diagnoses rely only on morphological, sometimes histopathological, identification, with cannot provide accurate differentiation between different species from *Anisakis* genus. Only in 7% of the reported cases it has been specified that somewhat molecular identification was performed (Shamsi and Barton, 2023). Therefore, clinical cases are usually attributed to *Anisakis* spp., in general.



**Figure 5.** *Anisakis* spp. life cycle scheme. 1) The definitive host (marine mammal) ingests the paratenic host harboring the infective L3, which develop into reproductive adults. 2) Unembryonated eggs are released with the feces. 3) Eggs embryonate in water (L1-L2/L3). 4) Eggs hatch releasing the free- swimming L2/L3. 5) L2/L3 are ingested by the first intermediate host (euphausiid) and develop in the coelom. 6) The euphausiid containing the infective L3 is preyed by a paratenic host (fish or squid). L3 migrate and remain infective in its tissues. 7) Accidental transmission to humans. L3 cannot further develop. Created with BioRender.com.

Humans get the infection through the consumption of raw or undercooked marine fish and squid (Ahmed et al., 2016). Several marine fish species have been identified to be hosts for *Anisakis* spp., indicating the low specificity of these parasites (Rahmati et al., 2020). Epidemiological studies provide important information that can be used in risk assessment, concerning the most common fishes affected in each geographical area, the prevalences detected on them, and the *Anisakis* species identified. The comprehensive review conducted by Rahmati et al. (2020) found that *Anisakis* larvae were more prevalent in fish from five families, namely Lophiidae, Trichiuridae, Zeidae, Merlucciidae, and Gadidae. These authors also assessed the geographical risk, identifying the following high-risk regions: North and Northeast Atlantic Ocean, Southwest of the USA, West of Mexico, South of Chile, East of Argentina, Norway, UK, and West of Iceland (99% confidence) (Figure 6).

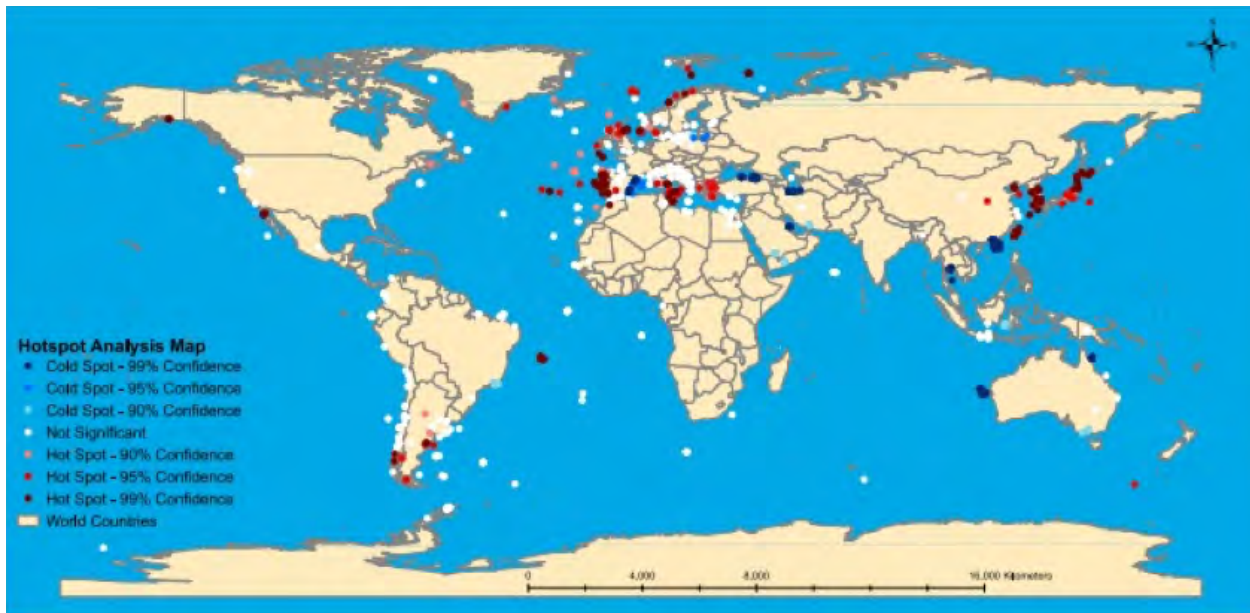


Figure 6. High-risk hot spots for *Anisakis* spp. in fishes. Source: Rahmati et al. (2020).

Concerning *Anisakis* species geographical distribution (both in definitive and intermediate hosts), *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* show different patterns. *A. simplex* s.s. is the most predominant species in the North Atlantic and North Pacific regions, while *A. pegreffii* is predominant in central and southern regions, highlighting the Mediterranean Sea. They are overlapping in some areas, like on the Northeast Atlantic coast of the Iberian Peninsula where coinfection occurs (Figure 7). Hybrids of both species have been largely detected, too (Mattiucci et al., 2018).

Number of reported cases of human anisakiosis is higher in countries with high per capita fish consumption and with culinary habits involving typical dishes based on raw or undercooked fish (Puente et al., 2008). Japan is the most affected country, followed by Spain, South Korea, Italy, and the USA (Shamsi and Barton, 2023). However, some authors agree on that anisakiosis is infra-diagnosed (Shamsi and Sheorey, 2018; Seal et al., 2020), as predictive models for risk assessment seem to support. For example, in Spain, the number of annually reported cases is over 150 (Herrador et al., 2019), while a predictive model based only on anchovies consumption in the same country estimated 8,000 cases/year (Bao et al., 2017). Anisakiosis mimics the symptomatology of other gastrointestinal pathologies. This fact, together with the lack of formation among medical professionals in this parasitic disease, leads them not to include it in the possible differential diagnosis; this results not only in underdiagnoses but also in misdiagnosis (Moschella et al., 2004; Ramos et al., 2005; Shibata et al., 2014; Shamsi and Barton, 2023).

- A. simplex* (s.s.) (▲●)
- A. pegreffii* (△●)
- A. berlandi* (△○)

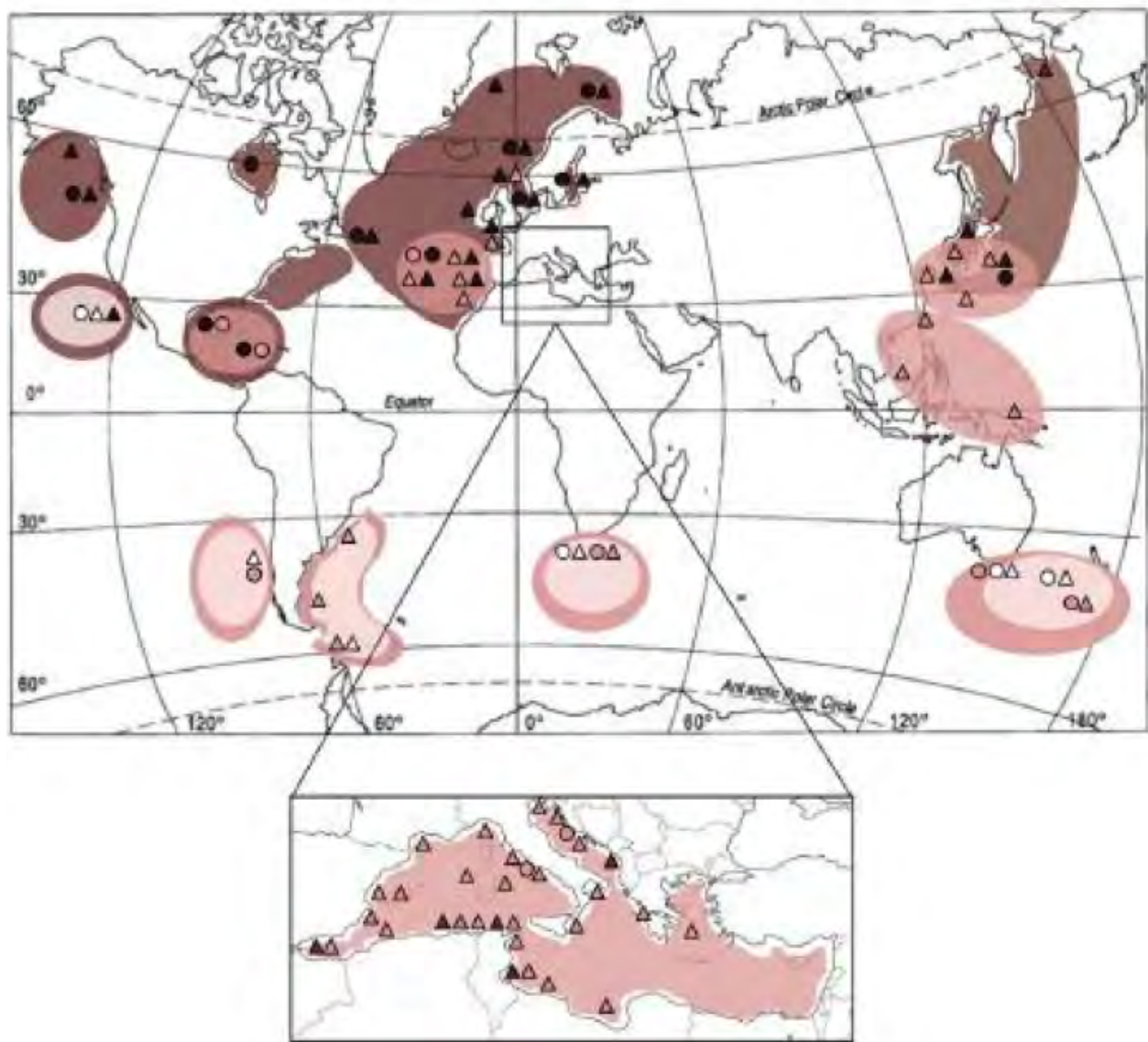


Figure 7. *Anisakis* species geographical distribution in the definitive hosts (circles) and intermediate/paratenic hosts (triangles). Source: Mattiucci et al. (2018).

“

*They are overlapping in some areas, like on the Northeast Atlantic coast of the Iberian Peninsula where coinfection occurs (Figure 7). Hybrids of both species have been largely detected, too (Mattiucci et al., 2018).*

”

### 2.3.3. Anisakiosis

Humans act as accidental hosts for *Anisakis* spp. The clinical illness results from the tissue damage caused by the ingested larvae when they attach to the gastric and occasionally intestinal mucosa. Different clinical manifestations have been reported (Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020):

- Gastric: is the most common presentation of anisakiosis and it is due to the larval attachment to the gastroduodenal mucosa. The onset takes place after two to six hours post-ingestion of the larvae and runs with epigastric pain, nausea, vomiting, diarrhoea, and urticaria. Symptoms remain while larvae are still alive.
- Intestinal: in this presentation, symptoms do not appear until day two or three and it is characterized by severe abdominal pain that can be accompanied by nausea, vomiting, or diarrhoea. Occasionally it can become chronic, with the formation of granulomas or abscesses.
- Extraintestinal anisakiosis, although rare, can occur if larvae manage to pass through the gastric wall and migrate to different organs causing specific symptomatology.

On the other side, gastroallergic anisakiosis is a recognized entity consisting of an acute IgE-mediated allergic response, characterized by urticaria, angioedema, or even severe anaphylaxis, that arises about 24 h after acute infection with live larvae and that is usually accompanied by mild gastric or abdominal symptoms (Daschner and Pascual, 2005). In addition, allergic anisakiosis associated with *Anisakis* sensitization, mainly chronic urticaria, has been frequently reported (Daschner et al., 2013). Currently, it still remains unclear if dead larvae, from previously frozen or adequately cooked fish, can trigger itself an allergenic response (Audicana et al., 2002; Alonso-Gómez et al., 2004; Daschner et al., 2012). To date, there are as far as fourteen recognized larval allergens (Mattiucci et al., 2017), with at least seven of them being excretory/secretory products (D'Amelio et al., 2020).

In recent years, allergic anisakiosis cases have increased, with an estimated global prevalence of 23.1% and the highest rates in Portugal, Norway, and Spain (Rahmati et al., 2020). *A. simplex* s.s. is considered to be the most implicated species in allergic anisakiosis (Ivanović et al., 2017), but also *A. pegreffii* is known to cause allergic reactions, for example in Italy (Mattiucci et al., 2013). In this country, marinated anchovies are the most common fish source of allergic anisakiosis (AAITO-IFIACI *Anisakis* consortium, 2011).

“ *A. simplex* s.s. is considered to be the most implicated species in allergic anisakiosis, but also *A. pegreffii* is known to cause allergic reactions, for example in Italy. ”

The diagnosis is mainly based on clinical manifestations together with patient history reporting the consumption of raw or undercooked fish. However, unspecific symptomatology can lead to misdiagnosis (Shimamura et al., 2016). Upper endoscopy is the definitive method to diagnose gastric anisakiosis (Bucci et al., 2013). Intestinal anisakiosis is more frequently misdiagnosed as appendicitis, peritonitis, or intestinal obstructions. Also, the difficulty of using upper endoscopy may lead to the need for exploratory laparotomy (Takei and Powell, 2007). Serological assays can be useful especially for allergic anisakiosis, although antigenic cross-reactivity can hamper the diagnosis (Ubeira, 2014).

Treatment is based on the removal of the alive larvae, either by upper endoscopy, colonoscopy, or during surgical intervention (Audicana et al., 2007). Drug therapy based on antihelmintics is not effective (Shimamura et al., 2016).

#### 2.3.4. Prevention and control

Different strategies must be combined to avoid or reduce the risk of ingesting alive larvae of *Anisakis* through the consumption of raw or undercooked fish products.

Epidemiological studies are a key step in assessing health risks in foodborne parasitic diseases. For anisakiosis, the cosmopolitan distribution of the nematode and its complex life cycle involving several hosts, together with international commercial trade of fishery products, hampers its prevention. However, anisakiosis risk can be considered negligible for farmed-raised species, as the life cycle cannot be completed because of feeding with extruded feed and net pens (Fioravanti et al., 2021; González et al., 2020).

The easiest but most effective strategy is to instruct people on the need to avoid the consumption of fish or fish products that have not been adequately cooked or frozen. *Anisakis* larvae inactivation occurs when cooking fish at 60 °C for at least one minute or by freezing at -20 °C for 24 h (González et al., 2020). These prevention measures for the general population have been translated into recommendations made by public health agencies and experts for specific sectors (e.g., the seafood industry), and finally, on legislation. In the European Union, freezing ( $\leq -20$  °C, for at least 24 h) is mandatory for fishery products in the following cases: (1) those products intended to be eaten raw or undercooked; (2) fishery products of some species, namely herring, mackerel, sprat, and Atlantic and Pacific wild salmon, when cold smoking ( $< 60$  °C) is the only treatment; and, (3) pickled or salted fishery products (Regulation (EC) No 853/2004).

#### 2.3.5. Current state of research and future directions

There are some aspects of *Anisakis* that have been widely studied, like taxonomy and phylogeny or epidemiological aspects. However, there are other several aspects for which the existing knowledge is still scarce, hampering biomedical research toward effective diagnosis and treatment. To date, the absence of a highly sensitive, specific, and easy-applying diagnostic technique and the unawareness of the professional medical staff in some regions have led to the infra-diagnosis of anisakiosis (Herrador et al., 2019; Seal et al., 2020). Additionally, the lack of drug targets explains the absence of effective medical treatment, now relying more on prevention (EFSA, 2010). Moreover, the comprehension of the pathogenic mechanisms, including a potential tumorigenic effect (Eskesen et al., 2001; Mineta et al., 2006), as well as the differential pathogenic potential between species, is still in its infancy (Cavallero et al., 2022a).

In recent years, advances in high-throughput sequencing as well as bioinformatics, in combination with *in vitro* and *in vivo* studies, have pushed a variety of -omic studies resulting in increased knowledge of different biological aspects of *Anisakis* (host-parasite interaction, physiopathological pathways, pathogenic mechanisms or allergen identification and characterization). This basic research is still developing and has the potential to be translated into applied biomedical research focused on the diagnosis, treatment, and prevention of anisakiosis. For example, identifying potential new drug targets or identifying new molecules that can serve as infection markers (D'Amelio et al., 2020; Cavallero et al., 2022a).

Alive *Anisakis* nematodes, mostly infective L3, isolated from naturally infected fish have been the main biological material used in the different studies. However, relying on environmental sources can be limiting because of their availability and the developmental stage needed (Mladineo et al., 2023). The setting up of a reliable protocol for *in vitro* culture of zoonotic nematodes is an efficient tool for providing higher numbers of different developmental stages, more homogenous populations, and/or enabling long-term survival of experimental specimens, which are necessary conditions for some protocols (Knox et al., 2007; Cheong et al., 2021). Therefore, sometimes research must focus on filling gaps in basic knowledge, for example, parasites *in vitro* life cycles, to better pursue translational research.

# 3 MARINE FISH AS CARRIERS OF EMERGING WATERBORNE UNICELLULAR PARASITES

## 3.1. EMERGING WATERBORNE UNICELLULAR PARASITES

Waterborne diseases occur worldwide due to the contamination of drinking water or by the accidental ingestion of contaminated bathing or recreational waters, including natural water bodies and pools (Karanis et al., 2007). Among parasites, protozoa are the most important group. They are found contaminating several water sources worldwide, increasing the risk of waterborne protozoan outbreaks.

Although most of the recorded outbreaks are caused by *Cryptosporidium* and *Giardia*, many other protozoa, including amoebas, ciliates, and other sporozoans, are transmitted through contaminated water and have been identified as causative agents of waterborne outbreaks (Plutzer and Karanis, 2016) (Figure 8). Microsporidia are generally included in this group of waterborne protozoa. However, their taxonomical classification has been controversial for decades and they have been finally recognized as fungi (Adl et al., 2019). Similarly occurs with *Blastocystis* sp. This parasite belongs to the Heterokonta -or Stramenopiles- phylum, one of the major divisions within the Eukaryota. Traditionally, Heterokonta members have been considered within the protist kingdom, but some current classifications, mainly *Catalogue of Life*, consider them into a recent new kingdom, namely Chromista (Ruggiero et al., 2015). Therefore, we prefer to refer herein as waterborne unicellular parasites, instead of waterborne protozoa. More precisely, as emerging waterborne unicellular parasites (EWUP), as most of the aforementioned parasites are considered to be emergent (NIAID, 2018).

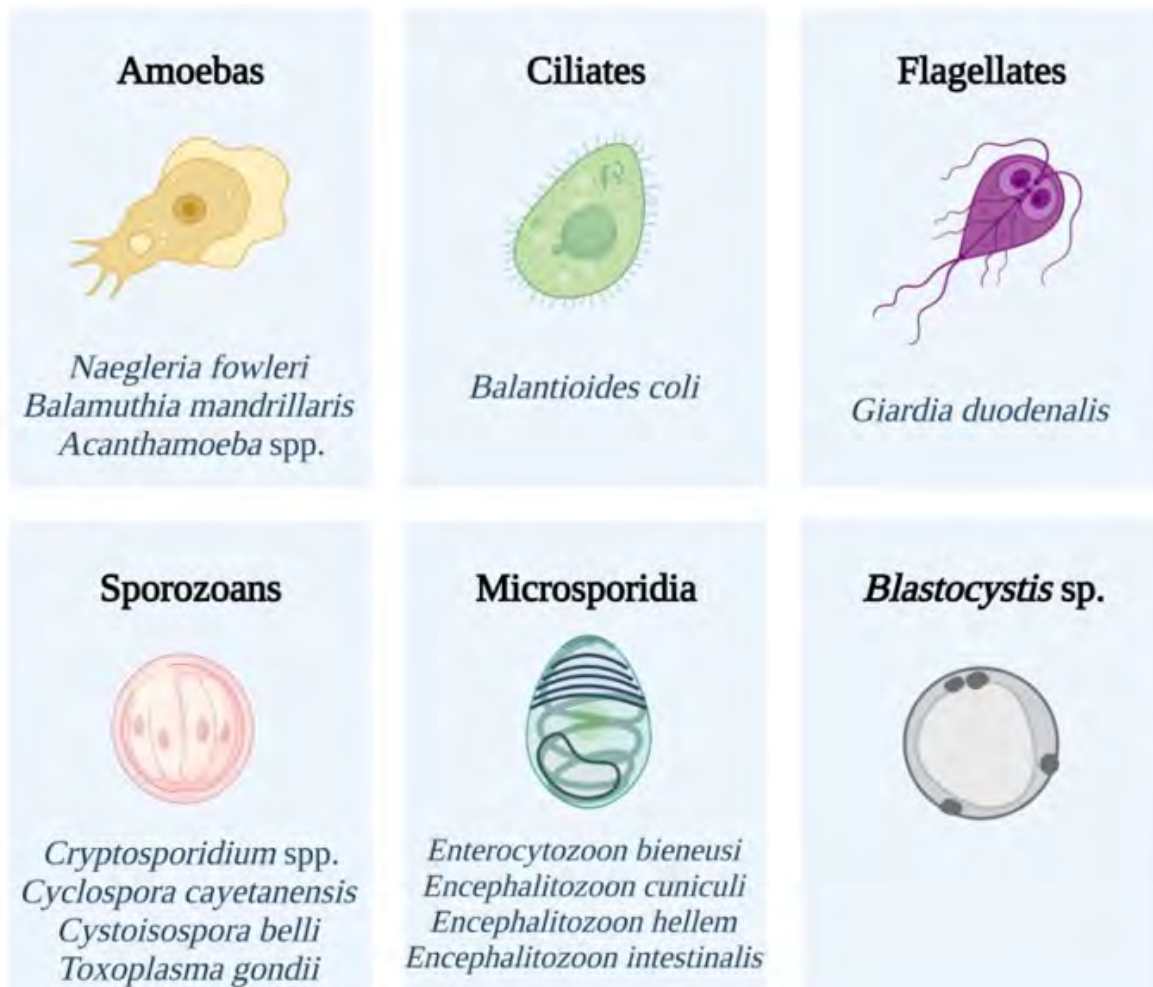


Figure 8. Main emerging waterborne unicellular parasites (EWUP). Created with BioRender.com.

**F**our major reviews have revised and compiled the overall of waterborne outbreaks registered worldwide since the beginning of the last century, which can be attributed to EWUP (Karanis et al., 2007; Baldursson and Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017; Ma et al., 2022). It is worth noting that the number of outbreaks has significantly increased over the years. Karanis et al., (2007) reported 325 outbreaks during a period encompassing almost a century. The first register was during the First World War, then a leap until the late 40s and 50s, and, finally, most of the cases were recorded from the last decades of the century. Baldursson and Karanis (2011) found as far as 199 outbreaks reports caused by EWUP during the short time span between 2004 and 2010; Efstratiou et al. (2017) recorded 381 outbreaks in an even shorter period (2011-2016); finally, Ma et al. (2022) registered 251 outbreaks from 2017 to 2020 (although they included outbreaks occurred before 2017 but later published, and therefore not included in the previous reviews).

“*This does not necessarily reflect the reality and it is more likely due to the surveillance programs and agencies existing only in developed countries (Efstratiou et al., 2017), together with the availability of appropriate and sensitive diagnostic methods (Adeyemo et al., 2018).*”

Waterborne outbreaks are linked to sanitary deficiencies, mainly lack of water sanitization, and therefore more likely to affect poor regions. Also, the impact of these waterborne diseases is of greater magnitude in developing countries (Yongsi, 2010; Kotloff et al., 2013; Siwila et al., 2020). However, the vast majority of EWUP outbreaks are reported in developed regions; America (especially the USA) and Europe (mainly the UK and Ireland), have registered the high number of outbreaks in the most recently assessed years, although Australia was leading the ranking during some previous years (Karanis et al., 2007; Baldursson and Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017; Ma et al., 2022). This does not necessarily reflect the reality and it is more likely due to the surveillance programs and agencies existing only in developed countries (Efstratiou et al., 2017), together with the availability of appropriate and sensitive diagnostic methods (Adeyemo et al., 2018).

Over the years, most of the EWUP outbreaks have been attributed to *Cryptosporidium* spp., followed by *Giardia duodenalis*. During the 2017-2020 period, they accounted for 76.49% and 19.12% of the total outbreaks, respectively (Ma et al., 2022). The remaining percentage is shared among all other EWUP. *Cryptosporidium* and *Giardia* are well-studied parasites that are easily transmissible due to their monoxenous life cycles, their zoonotic potential, and the high environmental resistance of their infective forms, being even resistant to industrial water treatments like chlorination (Karanis et al., 2007; Samarro Silva and Sabogal-Paz, 2021). These facts could contribute to explaining their presence and role as waterborne pathogens in developed countries and not only in poor regions where raw and untreated water is used for drinking, cooking, and bathing (Yongsi, 2010; Siwila et al., 2020).

Several other EWUP share these characteristics, but they have received little attention and seem to be underrepresented. Because of that, some authors consider them neglected (Plutzer and Karanis, 2016) and argue that inattention and the lack of rapid and sensitive diagnostic techniques to recover and detect the environmental forms of these parasites could be responsible for their underreporting (WHO, 2004). Fortunately, during the last few years, some improvements have been made in the detection of some of these neglected EWUP (Plutzer and Karanis, 2016), so reports should start to be more representative in the near future.

### 3.2. PRESENCE IN MARINE ENVIRONMENT

Natural body waters can be also contaminated with EWUP through different sources like urban, suburban, and agricultural surface run-off or sewage contaminated by infected humans and/or animals, both domestic (pets and livestock) and wildlife. Not only freshwater bodies are affected, but also the coastal and marine environment, where some of these parasites are known to parasitize and cause disease in different marine mammal species. Moreover, several shellfish are recognized to filtrate and accumulate some of these EWUP, posing a risk to human health (Fayer et al., 2004). There is also a potential risk from recreational bathing in coastal environments, even more, if we take into account that it has been demonstrated that the (oo)cysts of some of the main EWUP (*Cryptosporidium*, *Giardia*, and *T. gondii*) are able to resist the salinity (Brown et al., 1999; Nasser et al., 2003; Lindsay and Dubey, 2009). However, to date, among the outbreaks associated with recreational waters, none of them have been reported as having the origin in a seawater source (i.e., coastal, estuarine, or marine aquatic environments).

Although reports on EWUP presence in marine waters are scarce, some examples are found in the literature. *Cryptosporidium* and, to a lesser extent, *Giardia*, have been reported from different coastal environments (Robertson, 2007; Graczyk et al., 2010; Cristiane Pinto et al., 2020; Vieira et al., 2022). Some recent reports exist also for *Blastocystis* (Koloren et al., 2018; Vieira et al., 2022), the zoonotic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* (Graczyk et al., 2010), or some amoebas, namely *Entamoeba* (Vieira et al., 2022) and the free living *Acanthamoeba* spp. (Latifi et al., 2020; Salahuldeen et al., 2020).

Conversely, there are a large number of studies on the presence of EWUP in marine shellfish, highlighting the important role that shellfish play as sentinels in monitoring marine environment contamination (Lucy et al., 2008). Most of the reports are from *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *T. gondii* (Moratal et al., 2020), but other studies reported also the presence in molluscan shellfish of *C. cayetanensis* (Aksoy et al., 2014), microsporidia (Lucy et al., 2008), and *Blastocystis* (Martínez-Barbabosa et al., 2017).

“ Although reports on EWUP presence in marine waters are scarce, some examples are found in the literature. ”

### 3.3. POTENTIAL ROLE OF MARINE FISH IN TRANSMISSION

In recent years, this knowledge on EWUP entering marine ecosystems has enhanced the question about the possibility of other marine organisms, mainly fish, acting either as hosts or mechanical carriers for these parasites of terrestrial origin. Similar to the way in which molluscan shellfish filter the seawater and retain the parasitic forms, fish can get them during feeding, then reach the digestive system, or during breathing, being retained in gill filaments.

The role of fish as potential actors in EWUP life cycles has been studied only for *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis*, and *T. gondii*, relying on freshwater experimental models (review in Moratal et al., 2020). During the 90s, experimental infections were performed to ascertain if fish (aquarium fish and rainbow trout) could be truly infected by *Cryptosporidium parvum* (Arcay et al., 1995; Graczyk et al., 1996; Freire-Santos et al., 1998). These studies showed contradictory and not conclusive results, but they presented several limitations, such as the absence of molecular characterization, the use of different host species, and the employment of different analytical methods. An attempt at *G. duodenalis* experimental infection in zebrafish (*Danio rerio*) was also conducted and seemed to indicate that a true infection cannot be achieved (Tysnes et al., 2012). Finally, experimental infections for *T. gondii* were also performed. Omata et al. (2005) did not succeed in establishing the infection in the goldfish (*Carassius auratus*), while Sanders et al. (2015) were able to establish a successful acute infection in zebrafish. Akin to *Cryptosporidium*, the results were contradictory, but these studies used different species, different inoculation sites, and different methods of analysis. However, for *T. gondii* there are other evidences that suggest primary infections in fish (Taghadosi et al., 2010; Yoshida et al., 2020).

The question of whether fish could be infected by these parasites remained unclear. However, even if fish are acting only as mechanical carriers, they can still be a source of infection for humans, through seafood consumption, like shellfish are (Moratal et al., 2020). Therefore, epidemiological studies on cultivated and wild fish aiming to detect the presence of these parasites are of high importance for public health.

Some molecular epidemiological surveys have been conducted to detect the presence of zoonotic *Cryptosporidium* species, *G. duodenalis*, *T. gondii*, and *Blastocystis* sp. in fish (Gantois et al., 2020; Moratal et al., 2020; Rauff-Adedotun et al., 2022). However, information is still scarce, specifically concerning marine fish (Table 1).

Parasite	Location	Zoonotic species/variants identified	Study
<i>Blastocystis</i> sp.	Boulougne sur-Mer (Atlantic Northeast zone 27)	Subtypes ST2, ST7, ST8	Gantois et al., 2020
	Western Australia (Indian ocean zone 57.5)	<i>C. parvum</i> , <i>C. xiaoi</i> , pig genotype II	Reid et al., 2010
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Papua Guinea New Western Central (Pacific zone 71)	<i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i>	Koinari et al., 2013
	European seas	<i>C. parvum</i>	Certad et al., 2019
<i>Giardia duodenalis</i>	Western Australia (Indian ocean zone 57.5)	Genotypes A (A2) and B (B3, B4)	Yang et al., 2010
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sicily (Central Mediterranean zone 37.2.2)	<i>Toxoplasma gondii</i>	Marino et al., 2019

Table 1. Studies performed on marine fish targeting emerging waterborne unicellular parasites (EWUP).

## 4 REFERENCES

1. AAITO-IFIACI Anisakis Consortium, 2011. *Anisakis* hypersensitivity in Italy: Prevalence and clinical features: A multicenter study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 1563–1569. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02691.x>
2. Abreu-Acosta, N., Lorenzo-Morales, J., Leal-Guio, Y., Coronado-Álvarez, N., Foronda, P., Alcoba-Florez, J., et al., 2005. *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 848–855. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.05.010>
3. Adamska, M., 2020. First report of *Blastocystis* sp. subtypes in natural water bodies in north- western Poland: a one-year monitoring. *Int. J. Environ. Health Res.* 32, 862–869. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1803804>
4. Adeyemo, F.E., Singh, G., Reddy, P., Stenström, T.A., 2018. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop.* 184, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>
5. Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., et al., 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
6. Adroher-Auroux, F.J., Benítez-Rodríguez, R., 2020. Anisakiasis and Anisakis: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. *Res. Vet. Sci.* 132, 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.003>
7. Adroher, F.J., Malagón, D., Valero, A., Benítez, R., 2004. *In vitro* development of the fish parasite *Hysterothylacium aduncum* from the third larval stage recovered from a host to the third larval stage hatched from the egg. *Dis. Aquat. Organ.* 58, 41–45. <https://doi.org/10.3354/dao058041>
8. Ahmed, M., Ayoob, F., Kesavan, M., Gumaste, V., Khalil, A., 2016. Gastrointestinal anisakidosis – watch what you eat. *Cureus* 8, 8–11. <https://doi.org/10.7759/cureus.860>
9. Aibinu, I.E., Smooker, P.M., Lopata, A.L., 2019. *Anisakis* Nematodes in Fish and Shellfish - from infection to allergies. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 9, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.04.007>
10. Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Bayram Delibas, S., Giangaspero, A., 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/ High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* 44, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
11. Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M.C., Suarez-de-Parga, J.M., Daschner, A., Caballero, M.T., et al., 2004. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitol. Res.* 93, 378–384. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1085-9>
12. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
13. Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padrós, F., et al., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62, 133–145. <https://doi.org/10.3354/dao062133>
14. Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32, 1007–1021. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00058-9)
15. Ambros, V., 1989. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49–57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90171-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90171-2)
16. Ambros, V., Horvitz, H.R., 1984. Heterochronic Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 226, 409–416. <https://doi.org/10.1126/science.6494891>
17. Andreu-Ballester, J.C., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borrás, R., Catalán- Serra, I., et al., 2013. Microsporidia and its relation to Crohn disease. A retrospective study. *PLoS One* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062107>
18. Andrews, S., 2010. Babraham bioinformatics – FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. [WWW Document]. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed 07.04.2023).
19. Ángeles-Hernández, J.C., Gómez-de Anda, F.R., Reyes-Rodríguez, N.E., Vega-Sánchez, V., García-Reyna, P.B., Campos-Montiel, R.G., et al., 2020. Genera and species of the Anisakidae family and their geographical distribution. *Animals* 10, 2374. <https://doi.org/10.3390/ani10122374>
20. APROMAR, 2021. Informe 2021. La Acuicultura en España. [WWW Document]. URL <https://apromar.es/wp-content/uploads/2021/12/La-Acuicultura-en-Espana-2021.pdf> (accessed 01.10.22).
21. Arcay, L., Baez de Borges, E., Bruzual, E., 1995. Criptosporidiosis experimental en la escala de vertebrados: I infecciones experimentales, II estudio histopatológico. *Parasitol. día* 19, 20–29.

22. Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J., Fernandez-Jover, D., Martinez-Rubio, L., Lopez-Jimenez, J.A., et al., 2010a. Direct interaction between wild fish aggregations at fish farms and fisheries activity at fishing grounds: A case study with Boops boops. *Aquac. Res.* 42, 996–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02683.x>
23. Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J.T., Uglem, I., Mladineo, I., 2013. Reared fish, farmed escapees and wild fish stocks - A triangle of pathogen transmission of concern to Mediterranean aquaculture management. *Aquac. Environ. Interact.* 3, 153–161. <https://doi.org/10.3354/aei00060>
24. Arechavala-Lopez, P., Uglem, I., Sanchez-Jerez, P., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J.T., Nilsen, R., 2010b. Movements of grey mullet *Liza aurata* and *Chelon labrosus* associated with coastal fish farms in the western mediterranean sea. *Aquac. Environ. Interact.* 1, 127–136. <https://doi.org/10.3354/aei00012>
25. Asghari, A., Sadrebazaz, A., Shamsi, L., Shams, M., 2021. Global prevalence, subtypes distribution, zoonotic potential, and associated risk factors of *Blastocystis* sp. in domestic pigs (*Sus domesticus*) and wild boars (*Sus scrofa*): A systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.* 160, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105183>
26. Atopkin, D.M., Besprozvannykh, V.V., Yu Beloded, A., Ngo, H.D., Ha, N.V., Tang, N.V., 2017. Phylogenetic relationships of Hemiuridae (Digenea: Hemiuroidea) with new morphometric and molecular data of *Aphanurus mugilis* Tang, 1981 (Aphanurinae) from mullet fish of Vietnam. *Parasitol. Int.* 66, 824–830. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.009>
27. Attah, A.O., Sanggari, A., Li, L.I., Nik Him, N.A.I.I., Ismail, A.H., Meor Termizi, F.H., 2022. *Blastocystis* occurrence in water sources worldwide from 2005 to 2022: a review. *Parasitol. Res.* 122, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07731-0>
28. Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., Kennedy, M.W., 2002. *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trends Parasitol.* 18, 20-25. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02152-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02152-3)
29. Audicana, M.T., Del Pozo Gil, M.D., Daschner, A., 2007. Alergia al *Anisakis simplex*. In: SEAIC (Ed.), *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Ergon, Flowood, Misisipi, pp. 1-25.
30. Audicana, M.T., Kennedy, M.W., 2008. *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 360–379. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-07>
31. Aykur, M., Camyar, A., Türk, B.G., Sin, A.Z., Dagci, H., 2022. Evaluation of association with subtypes and alleles of *Blastocystis* with chronic spontaneous urticaria. *Acta Trop.* 231, 106455. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106455>
32. Bachiller, E., Giménez, J., Albo-Puigserver, M., Pennino, M.G., Mari-Mena, N., Esteban, A., et al., 2021. Trophic niche overlap between round sardinella (*Sardinella aurita*) and sympatric pelagic fish species in the Western Mediterranean. *Ecol. Evol.* 11, 16126–16142. <https://doi.org/10.1002/ece3.8293>
33. Baeza, M.L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., De Barrio, M., et al., 2004. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: Clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clin. Exp. Allergy* 34, 296–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01883.x>
34. Bahlool, Q.Z.M., Skovgaard, A., Kania, P.W., Buchmann, K., 2013. Effects of excretory/secretory products from *Anisakis simplex* (Nematoda) on immune gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.007>
35. Bahrami, F., Babei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T.R., Abdoli, A., 2020. *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 1027-1042. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03793-8>
36. Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>
37. Bao, M., Pierce, G.J., Pascual, S., González-Munõz, M., Mattiucci, S., Mladineo, I., et al., 2017. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: Anisakiasis. *Sci. Rep.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep43699>
38. Barati, M., KarimiPourSaryazdi, A., Rahmanian, V., Bahadory, S., Abdoli, A., Rezanezhad, H., et al., 2022. Global prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in rodents, birds, and water supplies: A systematic review and meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 208, 105770. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105770>
39. Bartie, K.L., Taslima, K., Bekaert, M., Wehner, S., Syaifudin, M., Taggart, J.B., et al., 2020. Species composition in the Molobicus hybrid tilapia strain. *Aquaculture* 526, 735433. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735433>
40. Benazzi, M., 1982. Speciation events as evidenced in Turbellaria. In: Barigozzi, C. (Ed.), *Mechanisms of Speciation*. Alan R. Liss, New York, pp. 307–344.
41. Benesh, D.P., Lafferty, K.D., Kuris, A., 2017. A life cycle database for parasitic acanthocephalans, cestodes, and nematodes. *Ecology* 98, 882. <https://doi.org/10.1002/ecy.1680>
42. Bojko, J., Reinke, A.W., Stentiford, G.D., Williams, B., Rogers, M.S.J., Bass, D., 2022. Microsporidia: a new taxonomic, evolutionary, and ecological synthesis. *Trends Parasitol.* 38, 642–659. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.05.007>
43. Bolland, S.J., Zahedi, A., Oskam, C., Murphy, B., Ryan, U., 2020. *Cryptosporidium bollandi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Exp. Parasitol.* 217, 107956. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107956>

44. Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., et al., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
45. Bouwknegt, M., Devleeschauwe, B., Graham, H., Robertson, L.J., van der Giessen, J., 2018. Prioritisation of foodborne parasites in Europe, 2016. *Euro Surveill.* 23, 17-00161. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161>
46. Bradley, I.M., Pinto, A.J., Guest, J.S., 2016. Design and evaluation of Illumina MiSeq-compatible 18S rRNA gene-specific primers for improved characterization of mixed phototrophic communities. *Appl. Environmental Microbiol.* 82, 5878–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16>
47. Bratley, J., Clark, K.J., 1992. Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). *Can. J. Zool.* 70, 274–279. <https://doi.org/10.1139/z92-041>
48. Broglia, A., Kapel, C., 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Vet. Parasitol.* 182, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.011>
49. Brown, T.I.M.J., Donaghy, M.J., Keys, E.A., Ionas, G., Learmonth, J.I.M.J., Mclenachan, P.A., et al., 1999. The viability of *Giardia intestinalis* and *Giardia muris* cysts in seawater. *Int. J. Environ. Health Res.* 9, 157–161. <https://doi.org/10.1080/09603129973290>
50. Bucci, C., Gallotta, S., Morra, I., Fortunato, A., Ciacci, C., Iovino, P., 2013. *Anisakis*, just think about it in an emergency! *Int. J. Infect. Dis.* 17, e1071–e1072. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.008>
51. Bušelić, I., Botić, A., Hrabar, J., Stagličić, N., Cipriani, P., Mattiucci, S., et al., 2018. Geographic and host size variations as indicators of *Anisakis pegreffii* infection in European pilchard (*Sardina pilchardus*) from the Mediterranean Sea: Food safety implications. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.021>
52. Cabral-de-Mello, D.C., Marec, F., 2021. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Mol. Genet. Genomics* 296, 513–526. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01765-2>
53. Cali, A., Becnel, J.J., Takvorian, P.M., 2017. Microsporidia. In: Archibald, J., Simpson, A., Slamovits, C. (Eds.), *Handbook of the Protists*. Springer, Cham, pp. 1559–1618.
54. Cali, A., Takvorian, P.M., 2014. Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 71–133.
55. Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
56. Carlson, C.J., Dallas, T.A., Alexander, L.W., Phelan, A.L., Phillips, A.J., 2020. What would it take to describe the global diversity of parasites?: The global diversity of parasites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1841>
57. Carlton, P.M., Davis, R.E., Ahmed, S., 2022. Nematode chromosomes. *Genetics* 221. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac014>
58. Carvalho, N., Guillen, J., 2021. Aquaculture in the Mediterranean. [WWW Document]. URL <https://www.iemed.org/publication/aquaculture-in-the-mediterranean/?lang=es> (accessed 05.24.2023).
59. Cavallero, S., Bellini, I., Pizzarelli, A., Arc, B., D'Amelio, S., 2022b. A miRNAs catalogue from third-stage larvae and extracellular vesicles of *Anisakis pegreffii* provides new clues for host-parasite interplay. *Sci. Rep.* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13594-3>
60. Cavallero, S., Bellini, I., Pizzarelli, A., D'Amelio, S., 2022a. What Do In Vitro and In Vivo Models Tell Us about Anisakiasis? New Tools Still to Be Explored. *Pathogens* 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030285>
61. Cavallero, S., Lombardo, F., Su, X., Salvemini, M., Cantacessi, C., D'Amelio, S., 2018. Tissue-specific transcriptomes of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* reveal potential molecular mechanisms involved in pathogenicity. *Parasit. Vectors* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2585-7>
62. Certad, G., Dupouy-Camet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Pottier, M., Guyot, K., et al., 2015. Identification of *Cryptosporidium* species in fish from Lake Geneva (Lac Léman) in France. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133047>
63. Certad, G., Follet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Guyot, K., Benamrouz-Vanneste, S., et al., 2019. Prevalence, molecular identification, and risk factors for *Cryptosporidium* infection in edible marine fish: A survey across sea areas surrounding France. *Front. Microbiol.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01037>
64. Chai, J.Y., Jung, B.K., 2020. Foodborne intestinal flukes: A brief review of epidemiology and geographical distribution. *Acta Trop.* 201, 105210. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105210>
65. Chai, J.Y., Murrell, K.D., Lymbery, A.J., 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues.

66. Int. J. Parasitol. 35, 1233–1254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>
67. Chai, J.Y., Shin, E.H., Lee, S.H., Rim, H.J., 2009. Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia.
68. Korean J. Parasitol. 47, 69–102. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.S.S69>
69. Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Exp. Parasitol. 124, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>
70. Chen, J., Jayachandran, M., Bai, W., Xu, B., 2022. A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. Food Chem. 369, 130874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874>
71. Cheng, H.W.A., Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Broaders, M.A., Mastitsky, S.E., 2011. Municipal wastewater treatment plants as removal systems and environmental sources of human- virulent microsporidian spores. Parasitol. Res. 109, 595–603. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2291-x>
72. Cheong, M.C., Wang, Z., Jaleta, T.G., Li, X., Lok, J.B., Kliewer, S.A., et al., 2021. Identification of a nuclear receptor/coactivator developmental signaling pathway in the nematode parasite *Strongyloides stercoralis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, 1–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021864118>
73. Chintagari, S., Hazard, N., Edwards, G., Jadeja, R., Janes, M., 2017. Risks associated with fish and seafood. Microbiol. Spectr. 5, 123–142. doi: 10.1128/microbiolspec.PFS-0013-2016
74. Choi, J., Park, J.S., 2020. Comparative analyses of the V4 and V9 regions of 18S rDNA for the extant eukaryotic community using the Illumina platform. Sci. Rep. 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63561-z>
75. Church, D.L., 2004. Major factors affecting the emergence and re-emergence of infectious diseases. Clin. Lab. Med. 24, 559–586. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2004.05.008>
76. Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., et al., 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. PLoS One 12, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659>
77. Cieloszyk, J., Goñi, P., García, A., Remacha, M.A., Sánchez, E., Clavel, A., 2012. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 30, 549–551. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.04.011>
78. Cipriani, P., Smaldone, G., Acerra, V., D’Angelo, L., Anastasio, A., Bellisario, B., et al., 2015. Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (s.s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: implications for food safety. Int. J. Food Microbiol. 198, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.019>
79. Clavel, A., Bargues, M.D., Castillo, F.J., Rubio, M.D., Mas-Coma, S., 1997. Diplogonoporiosis presumably introduced into Spain: first confirmed case of human infection acquired outside the Far East. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 317–320. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.317>
80. Cong, W., Elsheikha, H.M., 2021. Biology, epidemiology, clinical features, diagnosis, and treatment of selected fish-borne parasitic zoonoses. Yale J. Biol. Med. 94, 297–309.
81. Costa, J.F., Saraiva, A., 2015. *Cryptosporidium* cf. *scophthalmi* JFC-2015 18S 416 ribosomal RNA gene, partial sequence [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR340588.1> (accessed 12.10.21).
82. Costello, M.J., 2009. How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 276, 3385–3394. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0771>
83. Cotton, S., Donnelly, S., Robinson, M.W., Dalton, J.P., Thivierge, K., 2012. Defense peptides secreted by helminth pathogens: Antimicrobial and/or immunomodulator molecules? Front. Immunol. 3, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00269>
84. Cristescu, M.E., Hebert, P.D.N., 2018. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 49, 209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306>
85. Cristiane Pinto, K., de Souza Lauretto, M., Navarro González, M.I.J., Sato, M.I.Z., Nardocci, A.C., Razzolini, M.T.P., 2020. Assessment of health risks from recreational exposure to *Giardia* and *Cryptosporidium* in coastal bathing waters. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 23129–23140. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08650-2>
86. Cury, P., Bakun, A., Crawford, R.J.M., Jarre, A., Quiñones, R.A., Shannon, L.J., et al., 2000. Small pelagics in upwelling systems: Patterns of interaction and structural changes in ,wasp- waist ecosystems. ICES J. Mar. Sci. 57, 603–618. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0712>
87. D’amelio, S., Lombardo, F., Pizzarelli, A., Bellini, I., Cavallero, S., 2020. Advances in omic studies drive discoveries in the biology of anisakid nematodes. Genes (Basel). 11, 1–18. <https://doi.org/10.3390/genes11070801>
88. D’Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., et al., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. Int. J. Parasitol. 30, 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00178-2)

89. Daschner, A., Cuéllar, C., Rodero, M., 2012. The Anisakis allergy debate: Does an evolutionary approach help? *Trends Parasitol.* 28, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.001>
90. Daschner, A., Fernández-Fígares, V., Valls, A., de Frutos, C., Rodero, M., Ubeira, F.M., et al., 2013. Different fish-eating habits and cytokine production in chronic urticaria with and without sensitization against the fish-parasite *Anisakis simplex*. *Allergol. Int.* 62, 191–201. <https://doi.org/10.2332/allergolint.12-OA-0504>
91. Daschner, A., Pascual, C.Y., 2005. *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 281–285. [10.1097/01.all.0000168795.12701.fd](https://doi.org/10.1097/01.all.0000168795.12701.fd)
92. Davey, J.T., 1969. The Early Development of *Contraecaecum osculatum*. *J. Helminthol.* 43, 293–298. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00004843>
93. Davey, K.G., Kan, S.P., 1968. Molting in a parasitic nematode, *Phocanema decipiens*. IV. Ecdysis and its control. *Can. J. Zool.* 46, 893–898. <https://doi.org/10.1139/z68-125>
94. De Meester, N., Derycke, S., Bonte, D., Moens, T., 2011. Salinity effects on the coexistence of cryptic species: A case study on marine nematodes. *Mar. Biol.* 158, 2717–2726. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1769-5>
95. de Sousa, L.L., Silva, S.M., Xavier, R., 2019. DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environ. DNA* 1, 199–214. <https://doi.org/10.1002/edn3.27>
96. Deagle, B.E., Thomas, A.C., Shaffer, A.K., Trites, A.W., Jarman, S.N., 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: Which counts count? *Mol. Ecol. Resour.* 13, 620–633. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12103>
97. DeMone, C., Hwang, M.H., Feng, Z., McClure, J.T., Greenwood, S.J., Fung, R., et al., 2020. Application of next generation sequencing for detection of protozoan pathogens in shellfish. *Food Waterborne Parasitol.* 21, e00096. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00096>
98. Deng, L., Wojciech, L., Png, C.W., Kioh, D.Y.Q., Gu, Y., Aung, T.T., et al., 2023. Colonization with two different *Blastocystis* subtypes in DSS-induced colitis mice is associated with strikingly different microbiome and pathological features. *Theranostics* 13, 1165–1179. <https://doi.org/10.7150/thno.81583>
99. Díaz, P., Navarro, E., Prieto, A., Pérez-Creo, A., Viña, M., Díaz-Cao, J.M., et al., 2018. *Cryptosporidium* species in post-weaned and adult sheep and goats from N.W. Spain: Public and animal health significance. *Vet. Parasitol.* 254, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.040>
100. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.040>
101. Díaz, P., Quílez, J., Prieto, A., Navarro, E., Pérez-Creo, A., Fernández, G., et al., 2015. *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitol. Res.* 114, 4099–4105. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4639-0>
102. Dobson, A., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Jetz, W., 2008. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11482–11489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803232105>
103. Dowd, S.E., John, D., Eliopoulos, J., Gerba, C.P., Naranjo, J., Klein, R., et al., 2003. Confirmed detection of *Cyclospora cayentensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *J. Water Health* 1, 117–123. <https://doi.org/10.2166/wh.2003.0014>
104. Doyle, S.R., 2022. Improving helminth genome resources in the post-genomic era. *Trends Parasitol.* 38, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.06.002>
105. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA J.* 8, 1543. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1543>
106. Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Res.* 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
107. Eskesen, A., Strand, E.A., Andersen, S.N., Rosseland, A., Hellum, K.B., Strand, A., 2001. Anisakiasis presenting as an obstructive duodenal tumor. A Scandinavian case. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 75–76. <https://doi.org/10.1080/003655401750064149>
108. European Commission, Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries, 2022. El Mercado Pesquero de la EU - Edición 2022. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2771/624824>
109. Fæste, C.K., Jonscher, K.R., Dooper, M.M.W.B., Egge-Jacobsen, W., Moen, A., Daschner, A., et al., 2014. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteom.* 4, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.06.006>
110. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2022a. The state of world fisheries and aquaculture. Towards blue transformation. FAO, Rome. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
111. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2022b. The state of Mediterranean and Black Sea fisheries 2022. General Fisheries Commission for the Mediterranean, Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3370en>

112. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization), 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series 23, Rome, pp. 14–17.
113. Fayer, R., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2004. Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends Parasitol.* 20, 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.008>
114. Fayer, R., Santín, M., Macarasin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.028>
115. Fayer, R., Santin-Duran, M., 2014. Epidemiology of Microsporidia in human infections. In: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 135–164.
116. FEAP (Federation of European Aquaculture producers), 2022. Annual report 2022. [WWW Document]. URL <https://feap.info/index.php/2022/12/12/feap-annual-report-2022-released/> (accessed 05.22.23).
117. Feki, M., Châari, M., Neifar, L., 2016. Spatial variability of helminth parasites and evidence for stock discrimination in the round sardinella, *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847), off the coast of Tunisia. *J. Helminthol.* 90, 353–358. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000371>
118. Fernandez-Jover, D., Jimenez, J.A.L., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J., Casaldueño, F.G., Lopez, F.J.M., et al., 2007. Changes in body condition and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Mar. Environ. Res.* 63, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.05.002>
119. Fioravanti, M.L., Gustinelli, A., Rigos, G., Buchmann, K., Caffara, M., Pascual, S., et al., 2021. Negligible risk of zoonotic anisakid nematodes in farmed fish from European mariculture, 2016 to 2018. *Eurosurveillance* 26, 6–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.2.1900717>
120. Fiorenza, E.A., Wendt, C.A., Dobkowski, K.A., King, T.L., Pappaionou, M., Rabinowitz, P., et al., 2020. It's a wormy world: Meta-analysis reveals several decades of change in the global abundance of the parasitic nematodes *Anisakis* spp. and *Pseudoterranova* spp. in marine fishes and invertebrates. *Glob. Chang. Biol.* 26, 2854–2866. <https://doi.org/10.1111/gcb.15048>
121. Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M.J., Cotter, P.D., 2016. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol.* 16, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z>
122. Fredensborg, B.L., Poulin, R., 2005. In vitro cultivation of *Maritrema novaezealandensis* (Microphallidae): The effect of culture medium on excystation, survival and egg production. *Parasitol. Res.* 95, 310–313. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1293-3>
123. Freire-Santos, F., Vergara-Castiblanco, C.A., Tojo-Rodríguez, J.L., Santamarina-Fernandez, T., Ares-Mazas, E., 1998. *Cryptosporidium parvum*: An attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Parasitol.* 84, 935–938. <https://doi.org/10.2307/3284624>
124. Fuentes, M.V., Madrid, E., Meliá, L.V., Casañ, F., Sáez-Durán, S., Trelis, M., et al., 2022. Nematode parasites of the European Pilchard, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792): A genuine human hazard?. *Animals* 12, 1877. <https://doi.org/10.3390/ani12151877>
125. Galván, A.L., Magnet, A., Izquierdo, F., Fenoy, S., Rueda, C., Vadillo, C.F. V., et al., 2013. Molecular characterization of human-pathogenic microsporidia and *Cyclospora cayentanensis* isolated from various water sources in Spain: A year-long longitudinal study. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 449–459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02737-12>
126. Galván, A.L., Magnet, A., Izquierdo, F., Fernández Vadillo, C., Peralta, R.H., Angulo, S., et al., 2014. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Sci. Total Environ.* 468–469, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.053>
127. Gang, S.S., Castelletto, M.L., Yang, E., Ruiz, F., Brown, T.M., Bryant, A.S., et al., 2020. Chemosensory mechanisms of host seeking and infectivity in skin-penetrating nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 17913–17923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909710117>
128. Gantois, N., Lamot, A., Seesao, Y., Creusy, C., Li, L.L., Monchy, S., et al., 2020. First report on the prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in edible marine fish and marine mammals: A large scale-study conducted in atlantic northeast and on the coasts of Northern France. *Microorganisms* 8, 460. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030460>
129. Giribet, G., Edgecombe, G.D., 2017. Current understanding of Ecdysozoa and its internal phylogenetic relationships. *Integr. Comp. Biol.* 57, 455–466. <https://doi.org/10.1093/icb/ix072>
130. Giulietti, L., Nedberg, H.J., Karlsbakk, E., Marathe, N.P., Storesund, J.E., Mæhle, S., et al., 2022. Distribution of *Kudoa thyrssites* (Cnidaria, Myxozoa) myoliquefactive stages in Northeast Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) inferred from qPCR and histology. *Parasitol. Res.* 121, 2325–2336. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07575-8>

131. Glaser, R.W., 1917. Cited in: Lokwood, A. P. M., 1961. 'Ringer' solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp Biochem Physiol* 2, 241–289. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(61\)90113-X](https://doi.org/10.1016/0010-406X(61)90113-X)
132. Goldberg, T., Owens, L., 2023. Universal method for parasite and eukaryotic endosymbiont identification (WARF: P220194WO01) Wisconsin Alumni Research Foundation. [WWW Document]. <https://gtp.autm.net/public/project/71713/> (accessed 08.29.2023).
133. Golomazou, E., Malandrakis, E.E., Panagiotaki, P., Karanis, P., 2021. *Cryptosporidium* in fish: Implications for aquaculture and beyond. *Water Res.* 201, 117357. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117357>
134. Gomes, T.L., Quiazon, K.M., Itoh, N., Fujise, Y., Yoshinaga, T., 2023. Effects of temperature on eggs and larvae of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) and its possible role on their geographic distributions. *Parasitol. Int.* 92, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102684>
135. González, M.Á.P., Cavazza, G., Gustinelli, A., Caffara, M., Fioravanti, M., 2020. Absence of *Anisakis* nematodes in smoked farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) products on sale in European countries. *Ital. J. Food Saf.* 9, 216–219. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8615>
136. González, N., Calderón, J., Rúbies, A., Timoner, I., Castell, V., Domingo, J.L., et al., 2019. Dietary intake of arsenic, cadmium, mercury and lead by the population of Catalonia, Spain: Analysis of the temporal trend. *Food Chem. Toxicol.* 132, 110721. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110721>
137. González-Quirós R., Del Árbol, J., García-Pacheco, M.M., Silva-García, A.J., Naranjo, J.M., et al., 2011. Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fish. Res.* 109, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.01.031>
138. Goodrich, H.B., 1916. The germ cells in *Ascaris incurva*. *J. Exp. Zool.* 21, 61–99. <https://doi.org/10.1002/jez.1400210105>
139. Graczyk, T.K., Conn, D.B., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.N.S., et al., 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93, 385–391. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1142-4>
140. Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., 1996. *Cryptosporidium parvum* is not transmissible to fish, amphibians, or reptiles. *J. Parasitol.* 82, 748–751. <https://doi.org/10.2307/3283886>
141. Graczyk, T.K., Sunderland, D., Awantang, G.N., Mashinski, Y., Lucy, F.E., Graczyk, Z., et al., 2010. Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol. Res.* 106, 1103–1108. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1769-2>
142. Graczyk, T.K., Sunderland, D., Tamang, L., Shields, T.M., Lucy, F.E., Breyse, P.N., 2007. Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4095–4099. <https://doi.org/10.1128/AEM.00365-07>
143. Greige, S., El Safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., et al., 2018. Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites and Vectors* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2975-5>
144. Günther, B., Knebelberger, T., Neumann, H., Laakmann, S., Martínez Arbizu, P., 2018. Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Sci. Rep.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32917-x>
145. Han, B., Takvorian, P.M., Weiss, L.M., 2022. The function and structure of the Microsporidia polar tube. *Exp. suppl.* 114, 179-213. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-93306-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-93306-7_8)
146. Han, B., Weiss, L.M., 2017. Microsporidia: Obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016>
147. Harnett, W., 2014. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.007>
148. Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andrés, I., Alonso, F., Fenoy, S., et al., 2005. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3153–3157. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3153-3157.2005>
149. Hatcher, M.J., Dick, J.T.A., Dunn, A.M., 2012. Diverse effects of parasites in ecosystems: Linking interdependent processes. *Front. Ecol. Environ.* 10, 186–194. <https://doi.org/10.1890/110016>
150. Herman, J.S., Chiodini, P.L., 2009. Gnathostomiasis, another emerging imported disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 484–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-09>
152. Hernández-Orts, J.S., Scholz, T., Brabec, J., Kuzmina, T., Kuchta, R., 2015. High morphological plasticity and global geographical distribution of the Pacific broad tapeworm *Adenocephalus pacificus* (syn. *Diphyllobothrium pacificum*): Molecular and morphological survey. *Acta Trop.* 149, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.017>

153. Herrador, Z., Daschner, Á., Perteguer, M.J., Benito, A., 2019. Epidemiological scenario of anisakidosis in Spain based on associated hospitalizations: The tip of the iceberg. *Clin. Infect. Dis.* 69, 69–76. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy853>
154. Hino, A., Maruyama, H., Kikuchi, T., 2016. A novel method to assess the biodiversity of parasites using 18S rDNA Illumina sequencing; parasitome analysis method. *Parasitol. Int.* 65, 572–575. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.009>
155. Højgaard, D.P., 1998. Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. *Sarsia* 83, 21–28. <https://doi.org/10.1080/00364827.1998.10413666>
156. Homma, C., Inokuchi, D., Nakamura, Y., Uy, W.H., Ohnishi, K., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2022. Effectiveness of blocking primers and a peptide nucleic acid (PNA) clamp for 18S metabarcoding dietary analysis of herbivorous fish. *PLoS One* 17, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266268>
157. Huizinga, H.W., 1966. Studies on the Life Cycle and Development of *Contracaecum spiculigerum* (Rudolphi, 1809) (Ascaroidea: Heterocheilidae) from Marine Piscivorous Birds. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 82, 181–195.
158. Huizinga, H.W., 1967. The Life Cycle of *Contracaecum Multipapillatum* (Von Drasche 1882) Lucker, 1941 (Nematoda: Heterocheilidae). *J. Parasitol.* 53, 368–375.
159. IARC (International Agency for Research on Cancer) Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Biological agents. Volum 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum. 100, 1–441.
160. Iglesias, L., Valero, A., Benítez, R., Adroher, F.J., 2001. *In vitro* cultivation of *Anisakis simplex*: Pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. *Parasitology* 123, 285–291. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008423>
161. International Helminth Genomes Consortium, 2019. Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nat Genet* 51, 163–174. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0262-1>
162. Irle, T., Schierenberg, E., 2002. Developmental potential of fused *Caenorhabditis elegans* oocytes: Generation of giant and twin embryos. *Dev. Genes Evol.* 212, 257–266. <https://doi.org/10.1007/s00427-002-0232-5>
163. Ivanović, J., Baltić, M., Bošković, M., Kilibarda, N., Dokmanović, M., Marković, R., et al., 2017. *Anisakis* allergy in human. *Trends Food Sci. Technol.* 59, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.006>
164. Izquierdo, F., Castro-Hermida, J.A., Fenoy, S., Mezo, M., González-Warleta, del Aguila, C., 2011. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res.* 45, 4837–4843. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.033>
165. Izquierdo, F., Ollero, D., Magnet, A., Galván-Díaz, A.L., Llorens, S., Vaccaro, L., et al., 2022. Microsporidia as a potential threat to the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Animals* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3390/ani12192507>
166. Jasmer, D.P., Rosa, B., Tyagi, R., Mitreva, M., 2019. Omics driven understanding of the intestines of parasitic nematodes. *Front. Genet.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00652>
167. Johnson, P.T.J., Dobson, A., Lafferty, K.D., Marcogliese, D.J., Memmott, J., Orlofske, S.A., et al., 2010. When parasites become prey: Ecological and epidemiological significance of eating parasites. *Trends Ecol. Evol.* 25, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.005>
168. Kalatzis, P.G., Kokkari, C., Katharios, P., 2013. Description and relationships of two novel species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 infecting the gallbladders of Aulopiformes: Atlantic lizardfish *Synodus saurus* Linnaeus, 1758 and royal flagfin *Aulopus filamentosus* Bloch, 1792 from Cretan Sea, Greece. *Parasitol. Res.* 112, 2055–2061. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3366-7>
169. Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* 5, 1–38. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.002>
170. Kassambara, A., 2023. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.2 [WWW Document]. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/rstatix/> (accessed 2.20.23).
171. Kino, H., Hori, W., Kobayashi, H., Nakamura, N., Nagasawa, K., 2002. A mass occurrence of human infection with *Diplagonoporus grandis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) in Shizuoka Prefecture, central Japan. *Parasitol. Int.* 51, 73–79. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(01\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(01)00106-4)
172. Klimpel, S., Kuhn, T., Münster, J., Dörge, D.D., Klapper, R., Kochmann, J., 2019. Parasites of marine fish and cephalopods. A practical guide. Springer, Cham.
173. Knox, D.P., Geldhof, P., Visser, A., Britton, C., 2007. RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? *Trends Parasitol.* 23, 105–107. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.007>
174. Køie, M., Berland, B., Burt, M.D.B., 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 134–139. <https://doi.org/10.1139/f95-519>

175. Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A.J., Ryan, U.M., 2013. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Vet. Parasitol.* 198, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.031>
176. Koloren, Z., Gulabi, B.B., Karanis, P., 2018. Molecular identification of *Blastocystis* sp. subtypes in water samples collected from Black sea, Turkey. *Acta Trop.* 180, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.029>
177. König, G., Müller, H.E., 1997. *Blastocystis hominis* in animals: Incidence of four serogroups. *Zentralblatt für Bakteriologie* 286, 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(97\)80105-3](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(97)80105-3)
178. Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., et al., 2013. 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* 382, 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
179. Kounosu, A., Murase, K., Yoshida, A., Maruyama, H., Kikuchi, T., 2019. Improved 18S and 28S rDNA primer sets for NGS-based parasite detection. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52422-z>
180. Krysko, D. V., Agostinis, P., Krysko, O., Garg, A.D., Bachert, C., Lambrecht, B.N., et al., 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 32, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.005>
181. Kuchta, R., Esteban, J.G., Brabec, J., Scholz, T., 2014. Misidentification of *Diphyllbothrium* species related to global fish trade, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1955–1957. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140996>
182. Kuchta, R., Scholz, T., Brabec, J., Wicht, B., 2015b. Chapter 17. *Diphyllbothrium*, *Diplogonoporus* and *Spirometra*. In: Xiao, L., Ryan, U., Feng, F. (Eds.), *Biology of Foodborne Parasites*. CRC Press, Florida, pp. 299–326.
183. Kuchta, R., Serrano-Martínez, M.E., Scholz, T., 2015a. Pacific broad tapeworm *Adenocephalus pacificus* as a causative agent of globally reemerging diphyllbothriosis. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1697–1703. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150516>
184. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
185. Kvesić, M., Šamanić, I., Novak, A., Fredotović, Ž., Dželalija, M., Kamenjarin, J., et al., 2022. Submarine outfalls of treated wastewater effluents are sources of extensively- and multidrug-resistant KPC- and OXA-48-producing Enterobacteriaceae in coastal marine environment. *Front. Microbiol.* 13, 858821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858821>
186. Larsen, B.B., Miller, E.C., Rhodes, M.K., Wiens, J.J., 2017. Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life. *Q. Rev. Biol.* 92, 229–265.
187. Latifi, A., Salami, M., Kazemirad, E., Soleimani, M., 2020. Isolation and identification of free-living amoeba from the hot springs and beaches of the Caspian Sea. *Parasite Epidemiol. Control* 10, e00151. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00151>
188. Lažetić, V., Fay, D.S., 2017. Molting in *C. elegans*. *Worm* 6, e1330246. <https://doi.org/10.1080/21624054.2017.1330246>
189. Le Verge-Serandour, M., Turlier, H., 2021. A hydro-osmotic coarsening theory of biological cavity formation. *PLoS Comput. Biol.* 17, e1009333. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009333>
190. Lee, J. Der, Chung, L.Y., Lin, R.J., Wang, J.J., Tu, H.P., Yen, C.M., 2017. Excretory/secretory proteases and mechanical movement of *Anisakis pegreffii* infective larvae in the penetration of BALB/c mice gastrointestinal. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 33, 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.08.002>
191. Leitch, G.J., He, Q., 2011. Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed Res.* 25, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8)
192. Leuckart, R., 1876. *Die menschlichen Parasiten und die von ihnen herrührenden Krankheiten: vol. 2*. CF Winter'sche Verlagshandlung, Leipzig.
193. Levine, M.M., Nasrin, D., Acácio, S., Bassat, Q., Powell, H., Tennant, S.M., et al., 2020. 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. Heal.* 8, e204–e214. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30541-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30541-8)
194. Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., et al., 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 217–224. <https://doi.org/10.3201/eid2002.121797>
195. Li, W., Feng, Y., Santin, M., 2019. Host specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and public health implications. *Trends Parasitol.* 35, 436–451. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.004>
196. Lima dos Santos, C.A.M., Howgate, P., 2011. Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture* 318, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.046>
197. Lin, K.W., Yan, J., 2008. Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat. Res.* 658, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.08.006>

198. Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2009. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J. Parasitol.* 95, 1019–1020. <https://doi.org/10.1645/GE-1919.1>
199. Larena-Reino, M., Abollo, E., Regueira, M., Rodríguez, H., Pascual, S., 2015. Horizon scanning for management of emerging parasitic infections in fishery products. *Food Control* 49, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.005>
200. Lloyd, M.M., Poulin, R., 2011. *In vitro* culture of marine trematodes from their snail first intermediate host. *Exp. Parasitol.* 129, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.009>
201. Lokmer, A., Cian, A., Froment, A., Gantois, N., Viscogliosi, E., Chabé, M., et al., 2019. Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS One* 14, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211139>
202. Lom, J., Dyková, I., 2005. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitol. (Praha)*. 52, 69–81. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.010>
203. Lores, B., López-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., Del Aguila, C., 2002. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* in elderly human immunodeficiency virus- negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* 34, 918–921. <https://doi.org/10.1086/339205>
204. Louisy, P., 2006. Guía de identificación de los peces marinos de Europa y del Mediterráneo. Omega, Barcelona.
205. Lovy, J., Friend, S.E., 2015. Intestinal coccidiosis of anadromous and landlocked alewives, *Alosa pseudoharengus*, caused by *Goussia ameliae* n. sp. and *G. alosii* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.02.003>
206. Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Tamang, L., Miraflor, A., Minchin, D., 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103, 1369–1375. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1143-9>
207. Lyamzaev, K.G., Zinovkin, R.A., Chernyak, B. V., 2022. Extrusion of mitochondria: Garbage clearance or cell–cell communication signals? *J. Cell. Physiol.* 237, 2345–2356. <https://doi.org/10.1002/jcp.30711>
208. Ma, J.Y., Li, M.Y., Qi, Z.Z., Fu, M., Sun, T.F., Elsheikha, H.M., et al., 2022. Waterborne protozoan outbreaks: An update on the global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. *Sci. Total Environ.* 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150562>
209. Maloney, J.G., Molokin, A., Santin, M., 2019. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infect. Genet. Evol.* 73, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>
210. Marcogliese, D.J., 1997. Fecundity of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infecting grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada: Lack of density-dependent effects. *Int. J. Parasitol.* 27, 1401–1409. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00129-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00129-X)
211. Marino, A.M.F., Giunta, R.P., Salvaggio, A., Castello, A., Alfonzetti, T., Barbagallo, A., et al., 2019. *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. *Zoonoses Public Health* 66, 826–834. <https://doi.org/10.1111/zph.12630>
212. Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
213. Martínez De Velasco, G., Rodero, M., Chivato, T., Cuéllar, C., 2007. Seroprevalence of anti-*Kudoa* sp. (Myxosporea: Multivalvulida) antibodies in a Spanish population. *Parasitol. Res.* 100, 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0390-x>
214. Martínez De Velasco, G., Rodero, M., Cuéllar, C., Chivato, T., Mateos, J.M., Laguna, R., 2008. Skin prick test of *Kudoa* sp. antigens in patients with gastrointestinal and/or allergic symptoms related to fish ingestion. *Parasitol. Res.* 103, 713–715. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1017-1>
215. Martínez-Barbabosa, I., 2017. Identification by light microscopy of *Blastocystis* sp. in oysters *Crassostrea virginica*. *Integr. J. Vet. Biosci.* 1, 1–3. <https://doi.org/10.31038/ijvb.2017122>
216. Marzoug, D., Boutiba, Z., Gibson, D.I., Pérez-del-Olmo, A., Kostadinova, A., 2012. Descriptions of digeneans from *Sardina pilchardus* (Walbaum) (Clupeidae) off the Algerian coast of the western Mediterranean, with a complete list of its helminth parasites. *Syst. Parasitol.* 81, 169–186. <https://doi.org/10.1007/s11230-011-9335-6>
217. Mateo, M., de Mingo, M.H., de Lucio, A., Morales, L., Balseiro, A., Espí, A., et al., 2017. Occurrence and molecular genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in wild mesocarnivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 235, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.016>
218. Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.423-445.2005>
219. Matos, O., Lobo, M.L., Xiao, L., 2012. Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* infection in humans. *J. Parasitol. Res.* 2012, 36–45. <https://doi.org/10.1155/2012/981424>

220. Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M., Nascetti, G., 2018. Molecular epidemiology of *Anisakis* and *Anisakiasis*: An ecological and evolutionary road map. *Adv. Parasitol.* 99, 93–263. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.001>
221. Mattiucci, S., Colantoni, A., Crisafi, B., Mori-Uboldini, F., Caponi, L., Fazii, P., et al., 2017. IgE sensitization to *Anisakis pegreffii* in Italy: Comparison of two methods for the diagnosis of allergic anisakiasis. *Parasite Immunol.* 39, e12440. <https://doi.org/10.1111/pim.12440>
222. Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., Paoletti, M., Megna, A.S., Glielmo, A., et al., 2013. Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 496–499. <https://doi.org/10.3201/eid1903.121017>
223. McArthur, D.B., 2019. Emerging Infectious Diseases. *Nurs. Clin. North Am.* 54, 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>
224. McClelland, G., 1980. *Phocanema decipiens*: Growth, reproduction, and survival in seals. *Exp. Parasitol.* 49, 175–187. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(80\)90115-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(80)90115-0) McClelland, G., Ronald, K., 1974. *In vitro* development of the nematode *Contraecum osculatum* Rudolphi 1802 (Nematoda: Anisakinae). *Can. J. Zool.* 52, 847–855. <https://doi.org/10.1139/z74-114>
225. McSorley, H.J., Hewitson, J.P., Maizels, R.M., 2013. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.011>
226. Measures, L.N., 1996. Effect of temperature and salinity on development and survival of eggs and free-living larvae of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2804–2807. <https://doi.org/10.1139/cjfas-53-12-2804>
227. Mele, S., Pennino, M.G., Piras, M.C., Bellido, J.M., Garippa, G., Merella, P., 2014. Parasites of the head of *Scomber colias* (Osteichthyes: Scombridae) from the western Mediterranean Sea. *Acta Parasitol.* 59, 173–183. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0207-5>
228. Melentijevic, I., Toth, M.L., Arnold, M.L., Guasp, R.J., Harinath, G., Nguyen, K.C., et al., 2017. *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* 542, 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature21362>
229. Messina, C.M., Pizzo, F., Santulli, A., Bušelić, I., Boban, M., Orhanović, S., et al., 2016. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. *Parasit. Vectors* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1895-5>
230. Mineta, S., Shimanuki, K., Sugiura, A., Tsuchiya, Y., Kaneko, M., Sugiyama, Y., et al., 2006. Chronic anisakiasis of the ascending colon associated with carcinoma. *J. Nippon Med. Sch.* 73, 169–174. <https://doi.org/10.1272/jnms.73.169>
231. Mladineo, I., Charouli, A., Jelić, F., Chakroborty, A., Hrabar, J., 2023. *In vitro* culture of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae). *Parasit. Vectors* 16, 51. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05629-5>
232. Monaghan, S.R., Michael, L., K., Watral, V.G., Kaufman, R.J., Lee, L.E.J., Bols, N.C., 2009. Animal cell cultures in microsporidial research: their general roles and their specific use for fish microsporidia. *Vitr. Cell Dev Biol Anim* 45, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9172-3>
233. Moratal, S., Dea-Ayuela, M.A., Cardells, J., Marco-Hirs, N.M., Puigcercós, S., Lizana, V., et al., 2020. Potential risk of three zoonotic protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Toxoplasma gondii*) transmission from fish consumption. *Foods* 9, 1913. <https://doi.org/10.3390/foods9121913>
234. Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Pérez, R., Morillo, J.A., Alonso, J.L., 2018. 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* 221, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008>
235. Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., 2022. Simultaneous detection of less frequent waterborne parasitic protozoa in reused wastewater using amplicon sequencing and qPCR techniques. *J. Environ. Manage.* 314, 115029. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115029>
236. Moschella, C.M., Mattiucci, S., Mingazzini, P., De Angelis, G., Assenza, M., Lombardo, F., et al., 2004. Intestinal anisakiasis in Italy: case report. *J. Helminthol.* 78, 271–273. <https://doi.org/10.1079/joh2004237>
237. Moss, J.A., Snyder, R.A., 2019. Surveillance of Microsporidia and protozoan pathogens in Pensacola Florida: A one-year Study. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 617–624. <https://doi.org/10.1111/jeu.12708>
238. Moszczyńska, A., Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Marcogliese, D.J., Crease, T.J., 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase i gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02634.x>
239. Müller, F., Wicky, C., Spicher, A., Tobler, H., 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* 67, 815–822. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90076-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90076-B)

240. Muñoz, P., Sitjà-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., 2000. Antigenic characterization of *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxospora: Bivalvulida), a parasite from European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Teleostei: Serranidae). *Dis. Aquat. Organ.* 40, 117–124. <https://doi.org/10.3354/dao040117>
241. Nadler, S.A., Hudspeth, D.S.S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86, 380-393. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0380:POTANA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0380:POTANA]2.0.CO;2)
242. Nasser, A.M., Zaruk, N., Tenenbaum, L., Netzan, Y., 2003. Comparative survival of *Cryptosporidium*, coxsackievirus A9 and *Escherichia coli* in stream, brackish and sea waters. *Water Sci. Technol.* 47, 91–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0170>
243. Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udworthy, D., Varghese, N., Schulz, F., et al., 2021. A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nat. Biotechnol.* 39, 499–509. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
244. Nekouei, O., Vanderstichel, R., Thakur, K., Arriagada, G., Patanasatienkul, T., Whittaker, P., et al., 2018. Association between sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation on Atlantic salmon farms and wild Pacific salmon in Muchalat Inlet, Canada. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22458-8>
245. NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), 2018. NIAID Emerging infectious diseases/pathogens. [WWW Document]. <https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens> (accessed 06.06.2023).
246. Nielsen, M.K., Wang, J., Davis, R., Bellaw, J.L., Lyons, E.T., Lear, T.L., et al., 2014. *Parascaris univalens* - a victim of large-scale misidentification? *Parasitol. Res.* 113, 4485–4490. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4135-y>
247. Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J., 2018. Extensive uncharted biodiversity: The parasite dimension. *Integr. Comp. Biol.* 58, 1132–1145. <https://doi.org/10.1093/icb/icy039>
248. Omata, A.Y., Umeshita, Y., Murao, T., Kano, R., Kamiya, H., Kudo, A., et al., 2005. *Toxoplasma gondii* does not persist in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Parasitol.* 91, 1496–1499. <https://doi.org/10.1645/GE-3503RN.1>
249. Orosová, M., Markov, A., Provazník, I., Oros, M., Radačovsk, A., Čadkov, Z., et al., 2021. Molecular cytogenetic analysis of a triploid population of the human broad tapeworm, *Dibothriocephalus latus* (Diphyllobothriidea). *Parasitology* 148, 787–797. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000408>
250. Page, A.P., Stepek, G., Winter, A.D., Pertab, D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.003>
251. Palenzuela, O., Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium molnari* reveals a distinct piscine clade. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7646–7649. <https://doi.org/10.1128/AEM.01335-10>
252. Palenzuela, O., Redondo, M.J., Cali, A., Takvorian, P.M., Alonso-Naveiro, M., Alvarez-Pellitero, P., et al., 2014. A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae. *Int. J. Parasitol.* 44, 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.10.005>
253. Papparini, A., Yang, R., Chen, L., Tong, K., Gibson-Kueh, S., Lymbery, A., et al., 2017. *Cryptosporidium* in fish: Alternative sequencing approaches and analyses at multiple loci to resolve mixed infections. *Parasitology* 144, 1811–1820. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001214>
254. Parija, S.C., Jeremiah, S., 2013. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 3, 17-25.
255. Park, E., Poulin, R., 2021. Revisiting the phylogeny of microsporidia. *Int. J. Parasitol.* 51, 855–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.005>
256. Pastor-Valle, J., González, L.M., Martín-Clemente, J.P., Merino, F.J., Gottstein, B., Gárate, T., 2014. Molecular diagnosis of diphyllbothriasis in Spain, most presumably acquired via imported fish, or sojourn abroad. *New Microbes New Infect.* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1002/2052-2975.28>
257. Perelló, G., Díaz-Ferrero, J., Llobet, J.M., Castell, V., Vicente, E., Nadal, M., et al., 2015. Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend. *Food Chem. Toxicol.* 81, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.010>
258. Piepoli, M.F., Hoes, A.W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A.L., et al., 2016. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* 37, 2315–2381. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw106>
259. Piras, M.C., Tedde, T., Garippa, G., Virgilio, S., Sanna, D., Farjallah, S., et al., 2014. Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Vet. Parasitol.* 203, 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.003>
260. Plutzer, J., Karanis, P., 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* 101, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>

261. Podbielski, I., Hiebenthal, C., Hajati, M.C., Bock, C., Bleich, M., Melzner, F., 2022. Capacity for cellular osmoregulation defines critical salinity of marine invertebrates at low salinity. *Front. Mar. Sci.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.898364>
262. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., Livrelli, V., 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 49, 975–983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>
263. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C.P., Delbac, F., El Alaoui, H., 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8, 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>
264. Polley, S.D., Boadi, S., Watson, J., Curry, A., Chiodini, P.L., 2011. Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 60, 459–466. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026781-0>
265. Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N., Taberlet, P., 2012. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Mol. Ecol.* 21, 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>
266. Popruk, S., Adao, D.E.V., Rivera, W.L., 2021. Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: a review. *Infect. Genet. Evol.* 95, 105085. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105085>
267. Prokopowich, C.D., Gregory, T.R., Crease, T.J., 2003. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* 46, 48–50. <https://doi.org/10.1139/g02-103>
268. Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F.M., Cuéllar, C., 2008. *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp. Parasitol.* 118, 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.07.002>
269. Qiu, L., Xia, W., Li, W., Ping, J., Ding, S., Liu, H., 2019. The prevalence of microsporidia in China: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39290-3>
270. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
271. R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [WWW document]. URL <https://www.R-project.org/> (accessed 2.8.23).
272. Rahmati, A.R., Kiani, B., Afshari, A., Moghaddas, E., Williams, M., Shamsi, S., 2020. World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. *Parasitol. Res.* 119, 3585–3594. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06892-0>
273. Ramdani, S., Ramdane, Z., Slamovits, C.H., Trilles, J.P., 2022. *G. lugea* sp. infecting *Sardinella aurita* in Algeria. *J. Parasit. Dis.* 46, 672–685. <https://doi.org/10.1007/s12639-022-01483-5>
274. Ramilo, A., Abollo, E., Pascual, S., 2023. Molecular characterization of *Maccallumtrema xiphiados* (Trematoda: Azygiida) and *Molicola* sp. (Cestoda: Trypanorhyncha) infecting commercial frozen slices of Atlantic swordfish. *Int. J. Food Microbiol.* 389, 110103. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110103>
275. Ramos, L., Alonso, C., Guilarte, M. a R., Vilaseca, J., Santos, J., Malagelada, J.R., 2005. *Anisakis simplex* – induced small bowel obstruction after fish ingestion: preliminary evidence for response to parenteral corticosteroids. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 667–671. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00363-0)
276. Rauff-Adedotun, A.A., Nuur Syafyqah, S., Nur Soleha, R., Noranis Shahida, S., Farah Haziqah, M.T., 2022. Prevalence of *Blastocystis* sp. in freshwater fishes, poultry, and caprine from Penang, Malaysia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 33, 100749. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100749>
277. Rauff-Adedotun, A.A., Termizi, F.H.M., Shaari, N., Lee, I.L., 2021. The coexistence of *Blastocystis* spp. in humans, animals and environmental sources from 2010–2021 in Asia. *Biology (Basel)*. 10, 1–40. <https://doi.org/10.3390/biology10100990>
278. Reid, A., Lymbery, A., Ng, J., Tweedle, S., Ryan, U., 2010. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Vet. Parasitol.* 168, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.015>
279. Rivero-Juarez, A., Dashti, A., López-López, P., Muadica, A.S., Rivalde, M.D.L.A., Köster, P.C., et al., 2020. Protist enteroparasites in wild boar (*Sus scrofa ferus*) and black Iberian pig (*Sus scrofa domesticus*) in southern Spain: A protective effect on hepatitis e acquisition? *Parasites and Vectors* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04152-9>
280. Robertson, L.J., 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058>

281. Roca-Geronès, X., Segovia, M., Godínez-González, C., Fisa, R., Montoliu, I., 2020. Anisakis and *Hysterothylacium* species in Mediterranean and North-East Atlantic fishes commonly consumed in Spain: Epidemiological, molecular and morphometric discriminant analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 325, 108642. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108642>
282. Rocco, L., Costagliola, D., Stingo, V., 2001. (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in selachian chromosomes. *Heredity* 87, 583–588. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00945.x>
283. Rocha, S., Rangel, L.F., Casal, G., Severino, R., Soares, F., Rodrigues, P., et al., 2023. Occurrence of two myxosporean parasites in the gall bladder of white seabream *Diplodus sargus* (L.) (Teleostei, Sparidae), with the morphological and molecular description of *Ceratomyxa sargus* n. sp. *PeerJ* 11, e14599. <https://doi.org/10.7717/peerj.14599>
284. Rocha, S., Rangel, L.F., Castro, R., Severino, R., Azevedo, C., Santos, M.J., et al., 2016. Ultrastructure and phylogeny of *Ceratomyxa diplodae* (Myxosporea: Ceratomyxidae), from gall bladder of European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organ.* 121, 117–128. <https://doi.org/10.3354/dao03049>
285. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
286. Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., et al., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
287. Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., et al., 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10, 1–60. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
288. Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001085>
289. Ryan, U., Papparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'Hara, A., et al., 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp. Parasitol.* 150, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.009>
290. Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlasek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4302-4307.2003>
291. Sabatés, A., Martín, P., Lloret, J., Raya, V., 2006. Sea warming and fish distribution: The case of the small pelagic fish, *Sardinella aurita*, in the western Mediterranean. *Glob. Chang. Biol.* 12, 2209–2219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01246.x>
292. Sahara, K., Marec, F., Traut, W., 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosom. Res.* 7, 449–460. <https://doi.org/10.1023/A:1009297729547>
293. Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Petney, T.N., Andrews, R.H., 2021. Foodborne zoonotic parasites of the family Opisthorchiidae. *Res. Vet. Sci.* 135, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.024>
294. Salahuldeen, A., El-Aziz, A.A., Gad, M.A., Abou-El Nour, M.F., Al-Herrawy, A.Z., 2020. Potentially pathogenic free-living amoebae in fresh and sea waters from Alexandria, Egypt. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* 24, 307–318. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.116792>
295. Sammarro Silva, K.J., Sabogal-Paz, L.P., 2021. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. (oo)cysts as target-organisms in sanitation and environmental monitoring: A review in microscopy- based viability assays. *Water Res.* 189, 116590. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116590>
296. Sanders, J.L., Zhou, Y., Moulton, H.M., Moulton, Z.X., Mcleod, R., Dubey, J.P., et al., 2015. The zebrafish, *Danio rerio*, as a model for *Toxoplasma gondii*: An initial description of infection in fish. *J. Fish Dis.* 38, 675–679. <https://doi.org/10.1111/jfd.12393>
297. Santín, M., 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N. Z. Vet. J.* 61, 1–10. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.731681>
298. Santín, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* 90, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.014>
299. Santín, M., Gómez-Muñoz, M.T., Solano-Aguilar, G., Fayer, R., 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol. Res.* 109, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>
300. Saraiva, A., Eiras, J.C., Cruz, C., Xavier, R., 2023. Synopsis of the species of coccidians reported in marine fish. *Animals* 13, 2119. <https://doi.org/10.3390/ani13132119>
301. Sarhan, M., Land, W.G., Tonnus, W., Hugo, C.P., Linkermann, A., 2018. Origin and consequences of necroinflammation. *Physiol. Rev.* 98, 727–780. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2016>

302. Scheifler, M., Magnanou, E., Sanchez-Brosseau, S., Desdevises, Y., 2022. Host specificity of monogenean ectoparasites on fish skin and gills assessed by a metabarcoding approach. *Int. J. Parasitol.* 52, 559-567. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.02.001>
303. Scheifler, M., Ruiz-Rodríguez, M., Sanchez-Brosseau, S., Magnanou, E., Suzuki, M.T., West, N., et al., 2019. Characterization of ecto- and endoparasite communities of wild Mediterranean teleosts by a metabarcoding approach. *PLoS One* 14, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221475>
304. Schierenberg, E., Sommer, R.J., 2014. Chapter 2: Reproduction and development in Nematodes. In: Schmidt-Rhaesa, A. (Ed.), *Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera*. Volume 2:
305. Nematoda. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 61–108.
306. Scholz, T., Garcia, H.H., Kuchta, R., Wicht, B., 2009. Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 146–160. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-08>
307. Scholz, T., Kuchta, R., 2016. Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllobothrium* and relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites. *Food Waterborne Parasitol.* 4, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.002>
308. Schulze, J., Schierenberg, E., 2011. Evolution of embryonic development in nematodes. *EvoDevo* 2:18. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-2-18>
309. Seal, A., Harding, C., Shamsi, S., 2020. A preliminary report on the awareness and knowledge of seafood-borne parasitic diseases among medical doctors in Australia. *Parasitol. Int.* 74, 101993. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101993>
310. Shamsi, S., 2019. Seafood-borne parasitic diseases: A 'one-health' approach is needed. *Fishes* 4, 9. <https://doi.org/10.3390/fishes4010009>
311. Shamsi, S., 2020. Seafood-borne parasites in Australia: Human health risks, fact or fiction? *Microbiol. Aust.* 41, 33–37. <https://doi.org/10.1071/MA20009>
312. Shamsi, S., Barton, D.P., 2023. A critical review of anisakidosis cases occurring globally. *Parasitol. Res.* 122, 1733-1745. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07881-9>
313. Shamsi, S., Sheorey, H., 2018. Seafood-borne parasitic diseases in Australia: are they rare or underdiagnosed? *Intern. Med. J.* 48, 591–596. <https://doi.org/10.1111/imj.13786>
314. Shibata, E., Ueda, T., Akaike, G., Saida, Y., 2014. CT findings of gastric and intestinal anisakiasis. *Abdom. Imaging* 39, 257–261. <https://doi.org/10.1007/s00261-014-0075-3>
315. Shimamura, Y., Muwanwella, N., Chandran, S., Kandel, G., Marcon, N., 2016. Common symptoms from an uncommon infection: Gastrointestinal Anisakiasis. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, 5176502. <https://doi.org/10.1155/2016/5176502>
316. Sijjà-Bobadilla, A., Padrós, F., Aguilera, C., Alvarez-Pellitero, P., 2005. Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: From hatchery to market size. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 131–139. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.131-139.2005>
317. Siwila, J., Mwaba, F., Chidumayo, N., Mubanga, C., 2020. Food and waterborne protozoan parasites: The African perspective. *Food Waterborne Parasitol.* 20, e00088. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00088>
318. Skov, J., Kania, P.W., Olsen, M.M., Lauridsen, J.H., Buchmann, K., 2009. Nematode infections of maricultured and wild fishes in Danish waters: A comparative study. *Aquaculture* 298, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.024>
319. Smith, J.W., 1983. *Anisakis Simplex* (Rudolphi, 1809, Det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): Morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *J. Helminthol.* 57, 205–224. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00009512>
320. Smith, J.W., 1988. An electronic method for estimating the vaginal and uterine egg content of nematodes, with special reference to ascaridoids. *Can. J. Zool.* 66, 2253–2254. <https://doi.org/10.1139/z88-333>
321. Sofi, T.A., Fayaz, A., Sheikh, B.A., Sofi, O.M., Fazili, K.M. 2015. Cromosomas y citogenética de helmintos (Turbellaria, Trematoda, Cestoda, Nematodayacanthocephala). *Neotrop. Helminthol.* 9. <https://doi.org/10.24039/rnh201591787>
322. Starling, J.A., Maule, J., Hastie, N.D., Allshire, R.C., 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* 18, 6881–6888. <https://doi.org/10.1093/nar/18.23.6881>
323. Steele, J.A., Blackwood, A.D., Griffith, J.F., Noble, R.T., Schiff, K.C., 2018. Quantification of pathogens and markers of fecal contamination during storm events along popular surfing beaches in San Diego, California. *Water Res.* 136, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.056>
324. Stensvold, C.R., Clark, C.G., 2016. Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitol. Int.* 65, 763-771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>

325. Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., et al., 2016. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol.* 32, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>
326. Stentiford, G.D., Feist, S.W., Stone, D.M., Bateman, K.S., Dunn, A.M., 2013. Microsporidia: Diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends Parasitol.* 29, 567–578. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.005>
327. Sulaiman, I.M., Lal, A.A., Xiao, L., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88, 388–394. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0388:m-paero\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0388:m-paero]2.0.co;2)
328. Tachibana, T., Watari, T., 2020. *Kudoa septempunctata* infection: An underdiagnosed pathogen of acute gastrointestinal symptoms. *Qjm* 113, 43–44. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcz227>
329. Taghadosi, C., Kojouri, G.A., Taheri, M.A., 2010. Detection of *Toxoplasma* antibodies in sera of Salmonidae by ELISA. *Comp. Clin. Path.* 19, 203–206. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0849-0>
330. Takei, H., Powell, S.Z., 2007. Intestinal anisakidosis (anisakiosis). *Ann. Diagn. Pathol.* 11, 350–352. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2006.03.018>
331. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
332. Tanaka, R., Hino, A., Tsai, I.J., Palomares-Rius, J.E., Yoshida, A., Ogura, Y., et al., 2014. Assessment of helminth biodiversity in wild rats using 18S rDNA based metagenomics. *PLoS One* 9, e110769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110769>
333. Tang, C.Q., Leasi, F., Obertegger, U., Kieneker, A., Barraclough, T.G., Fontaneto, D., 2012. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16208–16212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209160109>
334. Tanrawatpan, C., Vaisusuk, K., Thanchomngang, T., Pilap, W., Sankamethawee, W., Suksavate, W., et al., 2023. Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from various animal hosts in Thailand. *Res. Vet. Sci.* 162, 104939. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.06.017>
335. Thomas, L.J., 1937. On the life cycle of *Contracaecum spiculigerum* (Rud.). *J. Parasitol.* 23, 429–431. Thurston-Enriquez, J.A., Watt, P., Dowd, S.E., Enriquez, R., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.* 65, 378–382. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.378>
336. Toledo Guedes, K., Sánchez-Jerez, P., González-Lorenzo, G., Brito Hernández, A., 2009. Detecting the degree of establishment of a non-indigenous species in coastal ecosystems: Sea bass *Dicentrarchus labrax* escapes from sea cages in Canary Islands (Northeastern Central Atlantic). *Hydrobiologia* 623, 203–212. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9658-8>
337. Toledo, R.D.S., Martins, F.D.C., Ferreira, F.P., De Almeida, J.C., Ogawa, L., Dos Santos, H.L.E.P.L., et al., 2017. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLoS One* 12, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175311>
338. Traut, W., Szczepanowski, M., Vitková, M., Opitz, C., Marec, F., Zrzavý, J., 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosom. Res.* 15, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1132-3>
339. Troell, M., Costa-Pierce, B., Stead, S., Cottrell, R.S., Brugere, C., Farmery, A., et al., 2023. Perspectives on aquaculture's contribution to the SDGs for improved human and planetary health. *J. World Aquac. Soc.* 54, 251–342. <https://doi.org/10.1111/jwas.12946>
340. Trumbić, Ž., Hrabar, J., Palevich, N., Carbone, V., Mladineo, I., 2021. Molecular and evolutionary basis for survival, its failure, and virulence factors of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii*. *Genomics* 113, 2891–2905. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.032>
341. Tysnes, K.R., Jørgensen, A., Poppe, T., Midtlyng, P.J., Robertson, L.J., 2012. Preliminary experiments on use of zebrafish as a laboratory model for *Giardia duodenalis* infection. *Acta Parasitol.* 57, 1–6. <https://doi.org/10.2478/s11686-012-0001-1>
342. Ubeira, F.M., 2014. Travelling with Anisakis allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 163, 243–244. <https://doi.org/10.1159/000360361>
343. Ugland, K.I., Strømnes, E., Berland, B., Aspholm, P.E., 2004. Growth, fecundity and sex ratio of adult whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in three whale species from the North-East Atlantic. *Parasitol. Res.* 92, 484–489. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1065-5>
344. Uglem, I., Karlsen, Ø., Sanchez-Jerez, P., Sæther, B.S., 2014. Impacts of wild fishes attracted to open-cage salmonid farms in Norway. *Aquac. Environ. Interact.* 6, 91–103. <https://doi.org/10.3354/aei00112>

345. Valles-Vega, I., Molina-Fernández, D., Benítez, R., Hernández-Trujillo, S., Adroher, F.J., 2017. Early development and life cycle of *Contracaecum multipapillatum* from a brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the Gulf of California, Mexico. *Dis. Aquat. Organ.* 125, 167–178. <https://doi.org/10.3354/dao03147>
346. Van Mai, H., Fotedar, R., 2018. Haemolymph constituents and osmolality as functions of moult stage, body weight, and feeding status in marron, *Cherax cainii* (Austin and Ryan, 2002) and yabbies, *Cherax destructor* (Clark, 1936). *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.03.007>
347. Vestheim, H., Jarman, S.N., 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Front. Zool.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12>
348. Vieira, C.B., Araújo, I.T., Ferreira, F.C., Liu, J., Feitosa, R.C., Miagostovich, M.P., 2022. Fast screening of enteropathogens in marine water samples. *Brazilian J. Microbiol.* 53, 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00770-w>
349. Villegas-Hernández, H., Muñoz, M., Lloret, J., 2016. Reproductive traits of the pompano, *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758), in the north-western Mediterranean. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 96, 1053–1063. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001265>
350. Walton, A.C., 1924. *Studies on nematodes gamatogenesis*. Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre, Berlin.
351. Walton, A.C., 1940. Gametogenesis. In: Chitwood, B.G., Chitwood, M.B. (Eds.), *An Introduction to Nematology*. Section II. Babylon, New York, pp. 205–215.
352. Wang, W., Owen, H., Traub, R.J., Cuttill, L., Inpankaew, T., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* 203, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.006>
353. Weiss, L.M., 2014. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
354. WHO (World Health Organization), 2004. *Waterborne Zoonoses. Identification, causes and control*. IWA Publishing, London.
355. Wickham, H., 2007. Reshaping data with the reshape package. *J. Stat. Softw.* 21, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>
356. Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.
357. Wickham, H., 2023. *forcats: Tools for Working with Categorical Variables (Factors)*. R package version 1.0.0. [WWW Document]. URL <https://CRAN.R-project.org/package=forcats> (accessed 8.9.2023).
358. Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., Vaughan, D., 2023. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.1.2. [WWW Document]. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr> (accessed 8.9.2023).
359. Wolpert, L., Tickle, C., Martínez Arias, A., 2015. *Principles of development*. Oxford University Press, USA.
360. Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* 124, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
361. Xie, Y., Zhang, L., 2022. Transcriptomic and proteomic analysis of marine nematode *Litoditis marina* acclimated to different salinities. *Genes* 13, 651. <https://doi.org/10.3390/genes13040651>
362. Yang, R., Palermo, C., Chen, L., Edwards, A., Papparini, A., Tong, K., et al., 2015. Genetic diversity of *Cryptosporidium* in fish at the 18S and actin loci and high levels of mixed infections. *Vet. Parasitol.* 214, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.013>
363. Yang, R., Reid, A., Lymbery, A., Ryan, U., 2010. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *Int. J. Parasitol.* 40, 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.001>
364. Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., et al., 2014. The SILVA and, all-species Living Tree Project (LTP) taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42, 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
365. Yongsri, H.B.N., 2010. Suffering for water, suffering from water: Access to drinking-water and associated health risks in Cameroon. *J. Heal. Popul. Nutr.* 28, 424–435. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v28i5.6150>
366. Yoshida, N., Domart, M.C., Peddie, C.J., Yakimovich, A., Mazon-Moya, M.J., Hawkins, T.A., et al., 2020. The zebrafish as a novel model for the in vivo study of *Toxoplasma gondii* replication and interaction with macrophages. *Dis. Model. Mech.* 13, dmm043091. <https://doi.org/10.1242/dmm.043091>
367. Zahedi, A., Bolland, S.J., Oskam, C.L., Ryan, U., 2021. *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Exp. Parasitol.* 223, 108089. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108089>
368. Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U., 2016. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5, 88–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>

370. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., et al., 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>
371. Zhao, H., Wang, M., Peng, X., Zhong, L., Liu, X., Shi, Y., et al., 2023. Fish consumption in multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational and clinical studies. *Ann. Transl. Med.* 11, 152–152. <https://doi.org/10.21037/atm-22-6515>
372. Ziarati, M., Zorriehzahra, M.J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., et al., 2022. Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *Vet. Q.* 42, 95–118. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2080298> ain branch.
- 

Samantha Moratal Martínez  
samantha.moratalmartinez@uchceu.es

**Título de la revisión:** A review of emerging zoonotic parasites in marine fish.

**Título de la Tesis:** Occurrence, molecular identification, and in vitro features of emerging zoonotic parasites in Mediterranean marine fish.

**Directores:** María Auxiliadora Dea Ayuela y Jordi López Ramon.

**Centro de realización:** Universidad Cardenal Herrera-CEU.

**Centro de presentación:** Universidad Cardenal Herrera-CEU.

**Fecha de lectura:** 17 de enero de 2024.

**Belén González Bertolín**

# REVISIÓN DE HELMINTOSIS OLVIDADAS Y EMERGENTES

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENERALIDADES DE LAS HELMINTOSIS

### 1.2. HELMINTOSIS OBJETO DE ESTUDIO

#### 1.2.1 Neurocisticercosis

- I. 2.1. 1. Ciclo biológico
- I. 2.1. 2. Manifestaciones clínicas y patogénesis
- I. 2.1. 3. Epidemiología
- I. 2.1. 4. Diagnóstico

#### 1.2.2 Hidatidosis

- I. 2.2. 1. Ciclo biológico
- I. 2.2. 2. Manifestaciones clínicas y patogénesis
- I. 2.2. 3. Epidemiología
- I. 2.2. 4. Diagnóstico

#### 1.2.3 Loasis

- I. 2.3. 1. Ciclo biológico
- I. 2.3. 2. Manifestaciones clínicas y patogénesis
- I. 2.3. 3. Epidemiología
- I. 2.3. 4. Diagnóstico

#### 1.2.4 Angiostrongilosis

- I. 2.4. 1. Ciclo biológico
- I. 2.4. 2. Manifestaciones clínicas y patogénesis
- I. 2.4. 3. Epidemiología
- I. 2.4. 4. Diagnóstico

#### 1.2.5 Gnathostomosis

- I. 2.5. 1. Ciclo biológico
- I. 2.5. 2. Manifestaciones clínicas y patogénesis
- I. 2.5. 3. Epidemiología
- I. 2.5. 4. Diagnóstico

### 1.3. TÉCNICAS DE MULTIPLEXADO BASADAS EN MBA

### 1.4. TECNOLOGÍAS DE SECUENCIACIÓN

- 1.4.1 Secuenciación de segunda generación
- 1.4.2 Secuenciación de tercera generación

### 1.5. GENOMAS PUBLICADOS EN HELMINTOS

## 2. BIBLIOGRAFÍA

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. GENERALIDADES DE LAS HELMINTOSIS

El término helminto deriva del griego *helmins* ("gusano parásito") y originariamente hacía referencia al aspecto de verme (gusano) característico de las fases adultas de estos parásitos. Dentro de este grupo de organismos existen dos filos principales con interés médico: *Platyhelminthes* y *Nematoda*. A su vez, los platelmintos se subdividen en dos clases: *Cestoda* (cestodos) y *Digenea* (trematodos) (McVeigh, 2020).

Tradicionalmente, la clasificación y diagnóstico de los helmintos se ha basado en su morfología, movilidad y características de sus ciclos biológicos. Los métodos diagnósticos varían en función del parásito. En las helmintosis intestinales, la observación macroscópica y/o microscópica del parásito eliminado por heces suele ser habitual y necesaria; sin embargo, en las helmintosis de órganos profundos, aunque en ocasiones se puede realizar el examen microscópico de una muestra del tejido afectado, suelen presentar una mayor complejidad. Debido a esto, las técnicas indirectas, principalmente de imagen y serológicas cobran una mayor importancia y son necesarias para el correcto diagnóstico de estas enfermedades (Prats, 2012).

Las enfermedades ocasionadas por helmintos se pueden clasificar por sus características epidemiológicas en: desatendidas, importadas, autóctonas y emergentes/reemergentes, cada una de ellas con distintos requerimientos diagnósticos.

Las helmintosis desatendidas están ligadas a pobreza y se localizan en regiones poco desarrolladas del planeta, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, donde suponen un grave problema de salud pública para los países que las padecen (World Health Organization, 2010). En estos casos existe la necesidad de desarrollar sistemas diagnósticos precisos y sensibles aplicables en zonas de bajos recursos. Son precisas herramientas diagnósticas que permiten el cribado masivo de grandes regiones endémicas en estas parasitosis tanto para el control, la vigilancia y la eliminación de estas enfermedades (World Health Organization, 2010).

Las helmintosis importadas son aquellas que no existen a nivel endémico en España, pero afectan a sus habitantes, ya sea debido a viajes a regiones afectadas o fenómenos migratorios (Vilajeliu Balagué et al., 2014). Este grupo de enfermedades pueden ser complejas de diagnosticar y los sistemas diagnósticos podrían presentar un mayor grado de desarrollo y sofisticación que en el caso de las enfermedades desatendidas. Los recursos sanitarios empleados pueden ser superiores ya que se realizan, fundamentalmente, en centros de referencia, al no formar parte de la rutina diagnóstica.

“*Las helmintosis autóctonas son aquellas que presentan un mayor grado de desarrollo en el diagnóstico y comprensión de la patología.*”

Las helmintosis autóctonas son aquellas que presentan un mayor grado de desarrollo en el diagnóstico y comprensión de la patología. En este grupo es necesario continuar con una vigilancia epidemiológica, que permita conocer la situación real de la enfermedad, y tomar las medidas preventivas y de salud pública pertinentes.

Finalmente, las enfermedades infecciosas emergentes/reemergentes son aquellas ocasionadas por un agente infeccioso recientemente identificado y anteriormente desconocido, capaz de causar problemas en salud pública a nivel local, regional o mundial o aquellas que ya existían, pero han aumentado rápidamente su incidencia (Morse, 1995). En el caso de las helmintosis, el enfoque diagnóstico dependerá de las condiciones de la emergencia y del patógeno implicado.

## 1.2. HELMINTOSIS OBJETO DE ESTUDIO

De las veinte entidades descritas como Enfermedades Tropicales Desatendidas, del inglés *Neglected Tropical Diseases* (NTDs) por la Organización Mundial de la Salud (OMS), once se corresponden con enfermedades de origen parasitario, siendo ocho de ellas enfermedades producidas por helmintos: dracunculosis, equinococosis, trematodosis transmitidas por alimentos, filariosis linfáticas, oncocercosis, esquistosomosis, geo-helmintosis y teniosis/cisticercosis. La hoja de ruta de la OMS para 2021-2030 establece objetivos ambiciosos para abordar el control y eliminación de muchas de estas enfermedades de forma integrada, siendo la quimioterapia preventiva, una de las herramientas principales (World Health Organization, 2020a). La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de dos de estas helmintosis desatendidas: teniosis/cisticercosis e hidatidosis. Además, también hemos incluido la loasis por su importancia a la hora de tomar decisiones en cuanto a la aplicación de tratamiento a la población frente a oncocercosis.

“*La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de dos de estas helmintosis desatendidas: teniosis/cisticercosis e hidatidosis.*”

Con respecto a las helmintosis importadas y emergentes, se ha estudiado la gnathostomosis y la angiostrongilosis, ya que, en nuestro país, actualmente, existen casos importados de gnathostomosis y además existe riesgo de emergencia de casos de angiostrongilosis (Delgado-Serra et al., 2022; Herman and Chiodini, 2009; Martin-Alonso et al., 2015).

Las principales características de estas enfermedades parasitarias seleccionadas son:

### 1.2.1. *Neurocisticercosis*

La neurocisticercosis (NCC) se produce en el humano por la ingestión accidental de los huevos del cestodo *Taenia solium* Linnaeus, 1758. Es la enfermedad parasitaria más común del sistema nervioso central a nivel global (Bazan et al., 2016). *Taenia solium* pertenece a la clase Cestoda, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae (Schoch et al., 2020). El cisticerco, o fase larvaria de *T. solium*, también recibe el nombre de *Cysticercus cellulosae*.

#### 1.2.1.1. *Ciclo biológico*

A diferencia de la teniosis, donde el ser humano participa como hospedador definitivo, en la cisticercosis el ser humano actúa como hospedador intermediario al ingerir accidentalmente huevos de origen exógeno, o bien si un individuo infectado regurgita los huevos a los tramos superiores del intestino delgado o al estómago. Los huevos eclosionan en el tubo digestivo liberando las oncosferas. Estas atraviesan la pared intestinal y alcanzan por vía hemática diversos tejidos, donde dan lugar a cisticercos similares a los que se encuentran en el hospedador intermediario habitual (el cerdo). Según la localización de los cisticercos, distinguimos, cisticercosis subcutánea, cisticercosis ocular y neurocisticercosis (NCC), en la presente tesis nos centraremos en esta última. En la NCC, la localización de los cisticercos es cerebral, llegando a alcanzar un tamaño aproximado de 5-8 mm o incluso mayor. *Taenia solium* es la única especie de tenia que produce neurocisticercosis en humanos (García et al., 2020; Prats, 2012). Aunque algunos autores sugieren que *Taenia asiatica* también pudiera tener ese potencial (Galán-Puchades and Fuentes, 2013).

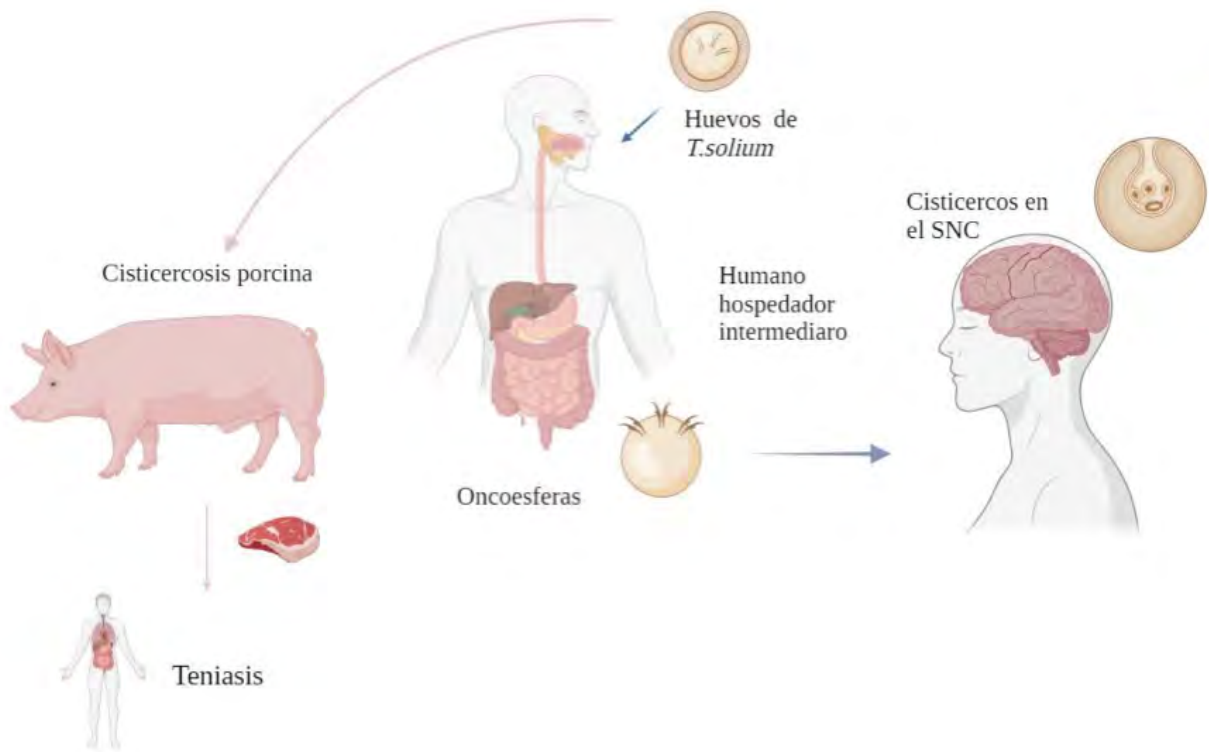


Figura 1. Ciclo biológico esquematizado de la especie *Taenia solium* causante de neurocisticercosis. Ilustración creada con Biorender®.

### 1.2.1.2. Manifestaciones clínicas y patogénesis

La enfermedad se presenta habitualmente en forma de convulsiones tónico-clónicas generalizadas o epilepsia parcial (Carabin et al., 2011; Del Brutto and Garcia, 2013). Es una de las parasitosis con afectación del sistema nervioso central más frecuentes, así como una de las causas prevenibles de epilepsia a nivel mundial (Raibagkar and Berkowitz, 2018). En las regiones endémicas, es la causa de uno de cada tres casos de epilepsia (Brizzi et al., 2016; Garcia et al., 2020; Melki et al., 2018; Rajshekhar, 2018; Singhi et al., 2018). Las manifestaciones clínicas y patogenia difieren según la localización de los cisticercos en el SNC (intra o extraparenquimales), el número de quistes (único o múltiples) y la viabilidad de los cisticercos (viables, degenerados o calcificados). Las formas de NCC con presencia de quistes intraparenquimales son las que presentan, con mayor frecuencia, crisis epilépticas; mientras que la presencia de quistes extraparenquimales (principalmente subaracnoideos o intraventriculares), se ha asociado a una mayor morbilidad y mortalidad (Garcia et al., 2020). En contraposición, también se ha descrito la presencia de cisticercos a nivel de tejido cerebral completamente asintomáticos, ya sea por hallazgos incidentales o en autopsias (de Almeida and Torres, 2011; Teerasukjinda et al., 2016). La combinación de todos estos factores, así como la respuesta inmune del hospedador condicionan las manifestaciones clínicas, que son poco específicas, y pueden variar desde parestesias, anestesia localizada, afasia, hidrocefalia, vasculitis, amnesia, siendo la más común, la ya citada, epilepsia (Del Brutto and Garcia, 2013).

Los cisticercos viables han mostrado múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune, entre ellos, cabe destacar la secreción de moléculas capaces de bloquear al sistema de complemento, modificar la respuesta celular, aumentar las células T reguladoras, neutralizar el efecto de inmunoglobulinas. Algunas de las moléculas implicadas serían: proteasas, inhibidores de proteasas, factores de inmunosupresión y otras moléculas similares a paramiosina, proteoglicanos sulfatados, prostaglandinas E2, taeniaestatina, y neuropéptidos como la sustancia P o la somatostatina (Garcia et al., 2020; Khumbatta et al., 2014).

En el ser humano se induce la síntesis de anticuerpos específicos (IgG), aunque su producción depende de las características de los cisticercos (localización, número y viabilidad). En una etapa más avanzada de la infección, algunos pacientes pueden desarrollar una respuesta granulomatosa que resulte en la destrucción del parásito, el cual se calcifica en un periodo de dos a siete años. Cuando se observa una o más calcificaciones, sin ninguna otra lesión en otra fase, se describe como NCC inactiva (Becerril, 2014). En la mayoría de los casos, la respuesta inmunitaria es leve y crónica, por lo que no se destruye al parásito, pero se produce afectación de los tejidos adyacentes, ocasionado vasculitis, fibrosis y astrogliosis. En el caso de cisticercos en degeneración, cuando los mecanismos de evasión de la respuesta inmune de los cisticercos no son efectivos, pueden desencadenar una intensa reacción inflamatoria. Este es el motivo por el que el tratamiento farmacológico debe realizarse bajo supervisión médica, preferiblemente en un centro hospitalario.

### 1.2.1.3. Epidemiología

La neurocisticercosis es la causa más frecuente de epilepsia prevenible a nivel mundial y supone el 30% de los casos de epilepsia en países endémicos. La carga de la enfermedad global se ha estimado en 1,61 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALY, *Disability Adjusted Life Years*) en 2017 (GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators, 2018; World Health Organization, 2020b).

La cisticercosis es endémica en zonas rurales de Asia, África Subsahariana y América Latina (Devleeschauwer et al., 2017; Garcia et al., 2020; Melki et al., 2018). Debido a la variabilidad en los estudios epidemiológicos, la falta de obligatoriedad en la notificación de los casos en muchos países y el miedo a la estigmatización, no es posible establecer el número de casos de manera rigurosa.

En Estados Unidos, la cisticercosis es mayoritariamente una entidad importada, asociada a inmigración, con un incremento de los casos en los últimos años (Spallone et al., 2020). Lo mismo sucede en Europa, donde incluso se discute la posible reemergencia de la cisticercosis/neurocisticercosis (Abraham et al., 2020; Del Brutto, 2012; Devleeschauwer et al., 2017). La mayoría de los casos en la región europea son importados debido a fenómenos migratorios, aunque únicamente Hungría, Islandia y Polonia, presentan un sistema obligatorio de notificación de casos, por lo que el número total de casos en Europa podría estar subestimado. En el periodo de tiempo comprendido entre los años 2000 a 2016, se han reportado 3489 casos en Europa, siendo España el país con mayor número (2116), seguido de Italia (832), Portugal (357) y Suiza (176) (Abraham et al., 2020).

“ En el periodo de tiempo comprendido entre los años 2000 a 2016, se han reportado 3489 casos en Europa, siendo España el país con mayor número (2116), seguido de Italia (832), Portugal (357) y Suiza (176) (Abraham et al., 2020). ”

#### 1.2.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la neurocisticercosis es complejo, ya que requiere de la combinación de una serie de técnicas diagnósticas y evidencias clínicas y epidemiológicas para establecer un diagnóstico definitivo (Del Brutto et al., 2017). Las técnicas de neuroimagen van a ser esenciales en el diagnóstico de la NCC, aportando información acerca de la localización, número y viabilidad del parásito. Entre las principales técnicas de neuroimagen cabe destacar la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral (Del Brutto et al., 2017).

Las técnicas de inmunodiagnóstico basadas en la detección de anticuerpos y/o antígenos permiten confirmar el diagnóstico de imagen. Se han comercializado test tanto de ELISA como de *Western blot* para la detección de anticuerpos específicos, normalmente utilizando antígenos crudos o parcialmente purificados del parásito con valores limitados de sensibilidad y especificidad (García et al., 2018b). La técnica de inmunoelectrotransferencia ligada a enzimas empleando extractos antigénicos (glucoproteínas) purificados mediante afinidad con lectina de lenteja (EITB-LLGP) es el método de referencia y más fiable para la detección de anticuerpos específicos de *T. solium* en suero o en líquido cefalorraquídeo, alcanzando un 100% de especificidad y 98% de sensibilidad, en pacientes con dos o más cisticercos viables (Tsang et al., 1989). Sin embargo, en pacientes con un solo cisticercos o lesiones calcificadas, la sensibilidad se reduce (Proaño-Narvaez et al., 2002). También se han empleado anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos del cisticercos mediante ELISA en muestras de suero o líquido cefalorraquídeo. Estas técnicas suelen obtener buenos resultados fundamentalmente en los casos de cisticercos viables ubicados en regiones extraparenquimales y son especialmente útiles para el seguimiento de la enfermedad una vez instaurado el tratamiento. Los antígenos detectados son: HP10 (Fleury et al., 2007), B158/B60 (Rodríguez et al., 2009) y TsG10 (Corda et al., 2022).

En cuanto a las técnicas moleculares, se han empleado distintos tipos de PCR, convencional (Hernández et al., 2008) y cuantitativa a tiempo real (qPCR) normalmente sobre líquido cefalorraquídeo (Yera et al., 2011) y también en muestras de plasma (O'Connell et al., 2020a). Las técnicas moleculares, al igual que las de detección de antígeno, presentan una mayor utilidad para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de los casos extraparenquimatosos. La identificación directa del parásito tras la biopsia cerebral no es posible en la mayoría de los casos, al no estar indicada la extracción quirúrgica de los cisticercos. Además, este procedimiento invasivo no es una alternativa factible para el diagnóstico de rutina ni el cribado epidemiológico (Del Brutto et al., 2017). Sin embargo, los cisticercos extraídos permitirían confirmar el diagnóstico mediante estudios posteriores por microscopía y técnicas moleculares.

#### 1.2.2. Hidatidosis

La hidatidosis quística o equinococosis quística (CE) es una zoonosis causada por la fase larvaria de *Echinococcus granulosus sensu lato*, perteneciente a la clase Cestoda, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae (Schoch et al., 2020), por lo que pertenece a la misma familia que el anterior parásito comentado en la presente tesis doctoral (*Taenia solium*). La transmisión en humanos está asociada al contacto con perros en zonas rurales donde se da el ciclo doméstico del parásito. Es una enfermedad crónica que puede pasar desapercibida debido a su lento desarrollo y falta de síntomas. España ha sido históricamente una región endémica y aunque ha descendido mucho su incidencia, aún se siguen diagnosticando casos (European Centre for Disease Prevention and Control., 2022; Herrador et al., 2016).

### 1.2.2.1. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Echinococcus* spp. es un ciclo zoonótico dependiente de la relación depredador-presa de dos hospedadores mamíferos. El parásito se mantiene en la naturaleza por los hábitos alimenticios carnívoros de los hospedadores definitivos (cánidos como el perro, lobo, zorros...), y por los hospedadores intermediarios (ovejas, cabras, vacas...) los cuales albergan el estadio larvario del parásito (metacestodo o quiste hidatídico). El cestodo adulto se localiza en el intestino delgado de los cánidos (Agudelo Higuita et al., 2016; Salazar Schettino and Cabrera Bravo, 2014; Wen et al., 2019a; Woolsey and Miller, 2021), donde se liberan los huevos que salen vehiculizados con las heces contaminando el medio: pastos, verduras, agua, etc. (Salazar Schettino and Cabrera Bravo, 2014). Tras la ingesta de los huevos por el hospedador intermediario, se libera la oncosfera (embrión hexacanto) que penetra en la mucosa intestinal, difunde por vía portal hasta el hígado, pudiendo alcanzar el pulmón a través de venas suprahepáticas. Además, puede difundir a cualquier localización vía general una vez que supera el pulmón, aunque es menos frecuente. Finalmente, a partir de la oncosfera se desarrolla la forma larvaria o quiste hidatídico, de cuya capa germinal surgen los protoescolices, fase infectiva para el hospedador definitivo, quien adquiere la parasitosis al alimentarse de vísceras de los hospedadores intermediarios. Cada protoescoléx dará lugar al estadio adulto en un periodo de 4 a 7 semanas en el hospedador definitivo (Agudelo Higuita et al., 2016; Salazar Schettino and Cabrera Bravo, 2014). En el caso de los humanos, se considera que estos son hospedadores accidentales o aberrantes, ya que es altamente improbable que perpetúen el ciclo (Agudelo Higuita et al., 2016). En el humano los huevos ingeridos eclosionan en el tubo digestivo, liberando las oncosferas que siguen la misma ruta que la indicada para los hospedadores intermediarios, migrando a diferentes órganos, donde pueden llegar a formar quistes hidatídicos, siendo el hígado y el pulmón las localizaciones más habituales (Kern et al., 2017).

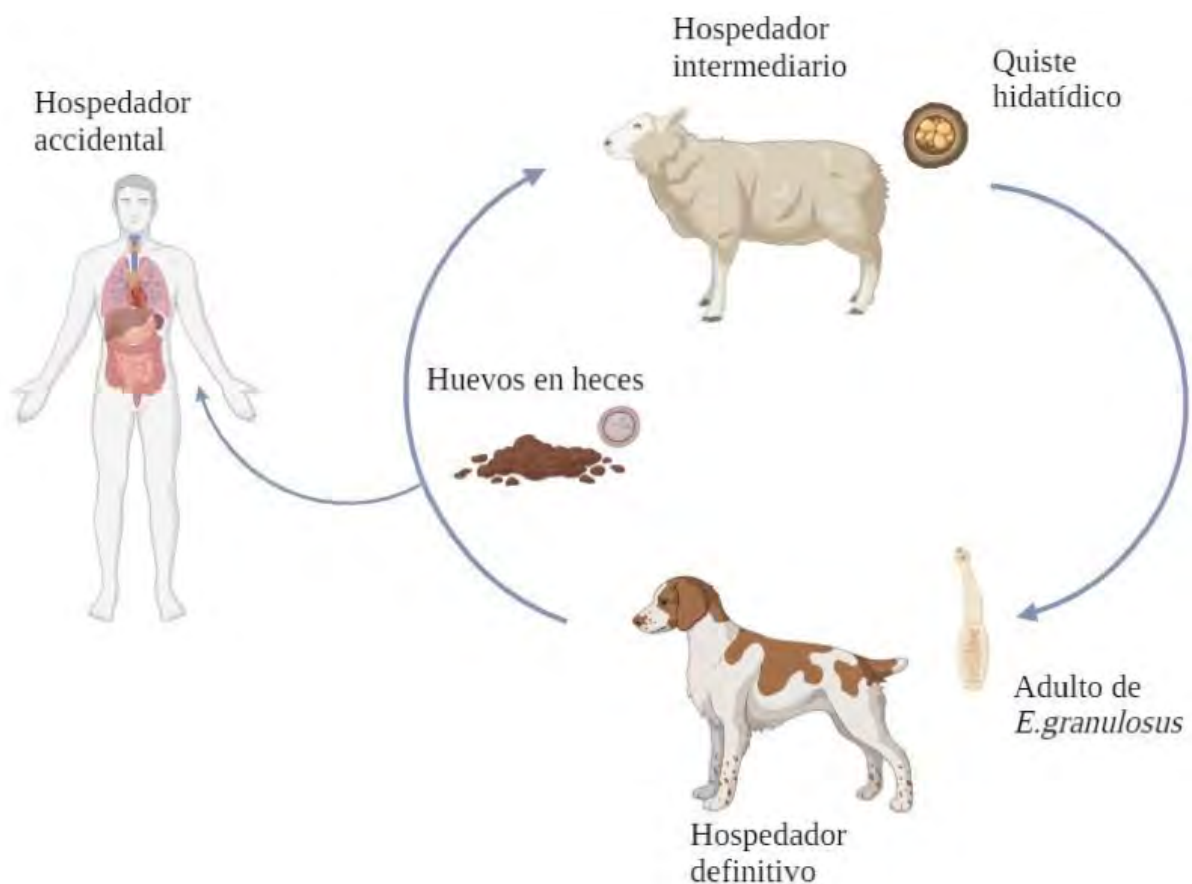


Figura 2. Ciclo biológico esquematizado de la especie *Echinococcus granulosus*. Ilustración creada con Biorender®.

### 1.2.2.2. Manifestaciones clínicas y patogénesis

La hidatidosis quística es habitualmente asintomática, aunque presenta un periodo de incubación y una presentación clínica variable en función del órgano implicado, la localización del quiste en el propio órgano, el número de quistes, el tamaño y la integridad de la pared. Las principales complicaciones se producen tras la ruptura del quiste, resultando en una infección de la zona afectada, anafilaxia o diseminación de protoescólices produciendo una hidatidosis secundaria. El efecto de compresión del quiste de las zonas adyacentes es otro de los mecanismos por los que el quiste puede ser sintomático (Agudelo Higueta et al., 2016). Los quistes pueden llegar a crecer entre 1-50 mm por año, o permanecer sin cambios durante años (Brunetti et al., 2010). A pesar de que las localizaciones más habituales son hígado (69-75%) y pulmón (17-22%) también se han descrito a nivel esplénico, renal, peritoneal, óseo y cerebral entre otras (Kern et al., 2017).

Las manifestaciones clínicas de los quistes hepáticos se caracterizan por dolor abdominal, dispepsia, fiebre o reacciones alérgicas, aunque la mayoría de los casos permanecen asintomáticos durante años. La complicación más frecuente es la ruptura del quiste en la cavidad peritoneal. Esta puede resultar en un shock anafiláctico o un abdomen agudo, pudiendo desencadenar la muerte del individuo (Kern et al., 2017; Wen et al., 2019a). De manera similar, los quistes pulmonares se adquieren, generalmente, durante la infancia y permanecen asintomáticos hasta la edad adulta, o incluso se diagnostican de manera incidental tras una exploración radiológica. La compresión a nivel bronquial puede desencadenar neumonía, atelectasias o una reacción inflamatoria. La ruptura del quiste puede producir expectoración de componentes del quiste, membranas, vesículas y fluido vesicular (vómica), así como rash urticarial con o sin fiebre y anafilaxia sistémica (Kern et al., 2017; Santivanez and Garcia, 2010).

Como resultado de la liberación de antígenos, se suele desarrollar inmunoglobulinas del tipo IgE, formando parte de una respuesta predominante tipo Th2, con altos niveles de interleucina 5 (IL-5) (Wen et al., 2019a).

### 1.2.2.3. Epidemiología

La hidatidosis es una enfermedad con una distribución global: presenta una mayor prevalencia en regiones rurales de Asia Central, China Continental, Europa del Este, así como en los países del Este de África y América del Sur (Larrieu et al., 2019; Ohiolei et al., 2020; Wen et al., 2019a). Se ha declarado su eliminación en algunos países insulares como Nueva Zelanda (Craig et al., 2017). Según el último informe epidemiológico anual redactado por el ECDC correspondiente a 2020 (European Centre for Disease Prevention and Control., 2022), se reportaron 529 casos confirmados de EC procedentes de los países de la Unión Europea. Alemania fue el país que reportó mayor número de casos (152), seguido de Bulgaria (95). Hay que considerar que la gran mayoría de los casos declarados en los países del norte de Europa, son importados. En España es una enfermedad de declaración obligatoria, donde se reportaron 8 casos de equinococosis en 2020 sin especificar especies ni genotipos implicados (European Centre for Disease Prevention and Control., 2022). Debido a su largo periodo de incubación y a las escasas medidas de vigilancia epidemiológica, es una enfermedad que se suele diagnosticar en la edad adulta, pese a que la infección es muy probable que se produzca durante la infancia. Debido a ello, junto a la mayor prevalencia en zonas rurales, esta zoonosis se caracteriza por una subestimación del número de casos (Lopez-Bernus et al., 2015). A nivel de epidemiología genética, dentro del complejo *Echinococcus granulosus sensu lato* hay una marcada variabilidad genética. El genotipo más frecuentemente asociado a hidatidosis humana es el G1 (88,4% de los casos) dentro de la especie *Echinococcus granulosus sensu stricto*, seguido de la especie *Echinococcus canadensis* (Larrieu et al., 2019; Maksimov et al., 2020).

#### 1.2.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la hidatidosis se realiza de acuerdo con los hallazgos clínicos, hallazgos de imagen y resultados serológicos y moleculares. Las técnicas de imagen son esenciales en el diagnóstico ya que proporcionan información acerca del tamaño, número de quistes, localización y en ocasiones de la viabilidad del parásito. La técnica de imagen más empleada es la ecografía abdominal, aunque también se realiza la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Brunetti et al., 2010). El grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud para Echinococcosis (WHO-IWGE) en 1995 clasificó en 3 grupos principales los diferentes quistes de acuerdo con las imágenes obtenidas por ecografía abdominal: activos (CE1 y CE2), transicionales (CE3) e inactivos (CE4 y CE5). En esta clasificación se basa la guía diagnóstica elaborada por Brunetti y colaboradores (Brunetti et al., 2016). Los métodos serológicos basados en la detección de anticuerpos circulantes se consideran una herramienta complementaria cuando el diagnóstico por imagen no sea concluyente. Hay una gran variedad de técnicas disponibles como son la hemaglutinación indirecta, aglutinación en látex, tiras inmunocromatográficas, ELISAs, inmunofluorescencia, inmunoblots en diversas versiones para la detección de IgG principalmente frente a antígenos crudos del parásito y purificados. En la práctica clínica, se recomienda el empleo de dos ensayos; uno tipo ELISA de alta sensibilidad y después un test más específico como el inmunoblot, como prueba confirmatoria y discriminación entre CE y equinococosis alveolar en las regiones donde coexisten ambas parasitosis. La principal limitación de estas técnicas es la falta de sensibilidad, ya que la disponibilidad de anticuerpos circulantes va a estar asociada a las características del quiste (localización, tamaño, viabilidad, entre otros (Hernández-González et al., 2018; Sánchez-Ovejero et al., 2020).

“*Existen también técnicas de detección directa del parásito como son: la detección histológica sobre biopsias y aspirados de líquido hidatídico del quiste, examen microscópico directo del contenido quístico para identificar protoescolices y PCR para detección de especie y cepa.*”

Existen también técnicas de detección directa del parásito como son: la detección histológica sobre biopsias y aspirados de líquido hidatídico del quiste, examen microscópico directo del contenido quístico para identificar protoescolices y PCR para detección de especie y cepa. Estas técnicas son de carácter confirmatorio, con una sensibilidad del 100%. Sin embargo, serían inviables como técnicas de diagnóstico rutinario debido a que conllevan un proceso invasivo.

#### 1.2.3. Loasis

La loasis es una enfermedad parasitaria producida por el nematodo *Loa loa*, perteneciente a la clase Chromadorea, orden Rhabditida, familia Onchocercidae (Schoch et al., 2020). Se transmite por los tábanos del género *Chrysops* (*C. silacea* y *C. dimidiata*) (Ndzeshang et al., 2020; Padgett and Jacobsen, 2008; Wanji et al., 2002). Se conoce de manera coloquial como la enfermedad del “gusano del ojo”.

### 1.2.3.1. Ciclo biológico

*Loa loa* se transmite al humano por las mordeduras de las especies hematófagas del tábano del género *Chrysops*: *Chrysops silacea* y *Chrysops dimidiata*. La larva infectiva (L3) penetra activamente en la piel a través de la herida provocada por el tábano. La larva en el humano evoluciona hasta el estadio adulto que permanece en el tejido subcutáneo. Los adultos pueden vivir hasta 15-21 años y ocasionan una enfermedad crónica en los portadores. Las hembras adultas liberan, en el tejido conectivo circundante, las microfilarias que rápidamente alcanzarán el torrente sanguíneo con periodicidad diurna, pudiendo localizarse también en esputo, orina, líquido cefalorraquídeo o pulmones (Boussinesq, 2006). Cuando la hembra *Chrysops* spp vuelve a alimentarse de un humano infectado podrá ingerir las microfilarias que se encuentran en la sangre periférica. En su interior pasarán por diferentes estadios larvarios hasta desarrollar la larva infectiva, que migra a la probóscide. Cuando los tábanos vuelvan a alimentarse, podrán inocular la L3 (Whittaker et al., 2018).

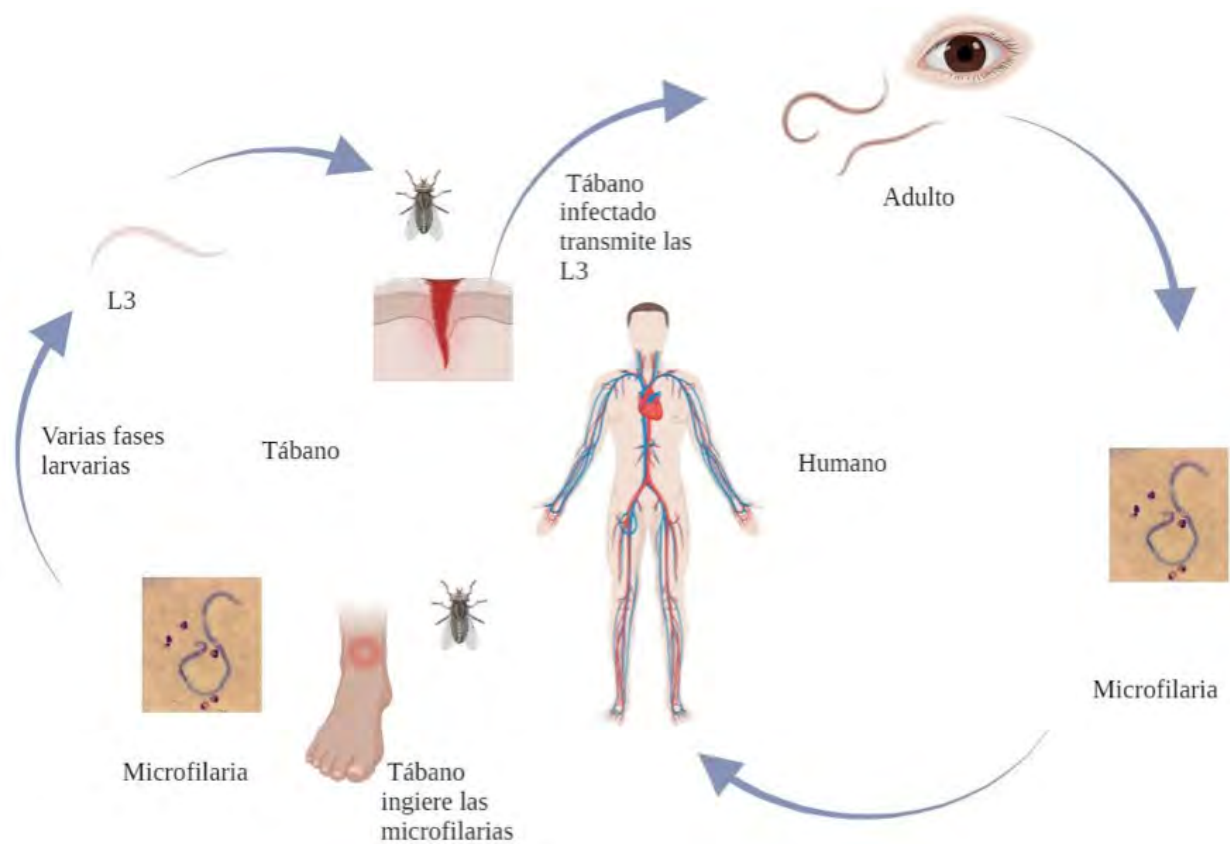


Figura 3. Ciclo biológico esquematizado de la especie *Loa loa*. L3: estadio larvario 3. Ilustración creada con Biorender®

### 1.2.3.2. Manifestaciones clínicas y patogénesis

La gran mayoría de los casos de loasis en regiones endémicas son asintomáticos o presentan síntomas leves (Akue et al., 2018; Padgett and Jacobsen, 2008). Las principales manifestaciones clínicas, se deben a las filarias adultas, y son: edema de Calabar (angioedema subcutáneo como consecuencia de la reacción de hipersensibilidad producida por la migración del adulto) y la visualización del estadio adulto de *Loa loa* en el ojo (hallazgo del parásito en la conjuntiva ocular) (Akue et al., 2018; Bouchaud et al., 2020; Padgett and Jacobsen, 2008; Puente et al., 2020). En pacientes de regiones no endémicas se evidencian manifestaciones alérgicas en mayor proporción con respecto a los pacientes residentes (Delabre et al., 2014).

Otros síntomas asociados a la infección por *L. loa* son prurito, urticaria y eosinofilia. Además, puede provocar complicaciones como nefropatías o encefalitis, debido principalmente a deposiciones de complejos inmunes y a la presencia de microfilarias en el líquido cefalorraquídeo, respectivamente (Metzger and Mordmüller, 2014a). Sin embargo, la presentación clínica es muy variable y depende fundamentalmente de la respuesta inmune y de la carga parasitaria. También es importante mencionar las graves encefalopatías (meningoencefalitis) en individuos con elevada microfilaremia tras el tratamiento farmacológico con ivermectina o dietilcarbamazina aplicado a la población en los programas de control de oncocercosis (Akie et al., 2018; Chesnais et al., 2017; Gardon et al., 1997).

### 1.2.3.3. Epidemiología

A nivel geográfico la loasis presenta una distribución limitada por la presencia del vector, el tábano del género *Chrysops*, siendo endémica en las regiones forestales del oeste y centro del continente africano, concretamente en los países de Guinea Ecuatorial, Angola, Chad, República Democrática del Congo, Camerún, República Centroafricana, Gabón, Nigeria, Sudán del Sur y la República del Congo (Zouré et al., 2011). Está entre la segunda y tercera causa de consulta médica en estas áreas (Metzger and Mordmüller, 2014a). Se estima que, de los 30 millones de personas residentes en estas regiones afectadas, en torno a 10 millones están infectadas de loasis, aunque es probable que este dato esté subestimado. En las regiones de mayor endemidad la prevalencia en la población puede alcanzar el 60% con una media de microfilarias por mililitro de sangre elevada (Whittaker et al., 2018).

Su distribución geográfica coincide con la de otras filarias, entre las que se encuentran *Mansonella perstans*, *Mansonella streptocerca*, *Wuchereria bancrofti* y *Onchocerca volvulus* lo que dificulta el diagnóstico diferencial y el tratamiento adecuado para cada una de ellas (Ta et al., 2018).

Existen fármacos antiparasitarios eficaces frente a *Loa loa* como la dietilcarbamazina (potente microfilaricida de efecto rápido y macrofilaricida) y la ivermectina (microfilaricida). Es necesario tener en cuenta que estos tratamientos no son seguros para los individuos que presentan un alto nivel de microfilarias, en los que es recomendable realizar tratamientos progresivos combinados con corticoides. Debido a ello resulta complejo realizar un programa eficaz para la reducción de la prevalencia y el control de esta filariosis en las áreas endémicas (Gardon et al., 1997; Herrick et al., 2017).

“  
Existen fármacos antiparasitarios eficaces frente a *Loa loa* como la dietilcarbamazina (potente microfilaricida de efecto rápido y macrofilaricida) y la ivermectina (microfilaricida).  
”

En un estudio realizado en España sobre la loasis importada procedente de Guinea Ecuatorial, resalta que el 72,5% de los pacientes presentaron microfilaremia positiva y eran completamente asintomáticos, aunque sí que presentaron eosinofilia. De este modo, a la hora de establecer la pauta terapéutica de un paciente procedente de estas regiones con eosinofilia, sería conveniente determinar la microfilaremia, con el objetivo de evitar las reacciones adversas asociadas al uso de fármacos (Puente et al., 2020).

#### 1.2.3.4. Diagnóstico

Las principales técnicas diagnósticas de loasis se agrupan en: diagnóstico clínico, microscópico, serológico y molecular. El diagnóstico presuntivo se basa en la observación del gusano adulto en la conjuntiva ocular o de la evidencia del edema de Calabar. De este modo, la identificación microscópica del estadio adulto de *Loa loa*, ya sea tras su extracción ocular o cutánea, permite confirmar el diagnóstico de la enfermedad. También se realiza la identificación microscópica de las microfilarias en frotis de sangre; la muestra de sangre debe ser tomada a mediodía y se puede emplear un frotis fresco o con tinción de Giemsa (Rosenblatt, 2009). En caso de baja parasitemia se puede recurrir a métodos de concentración como la técnica de Knott (Melrose et al., 2000). Además, existe un dispositivo portátil basado en microscopia para la identificación y conteo de las microfilarias, es el denominado LoaScope, para aplicación en campo (D'Ambrosio et al., 2015). Sin embargo, hay que considerar las limitaciones de la microscopia, dado que una elevada proporción de pacientes de loasis presenta amicrofilaremia (Pinder et al., 1988), sumado a los requerimientos de personal cualificado para la realización y el hecho de que en infecciones recientes la liberación de las microfilarias no es inmediata (Rosenblatt, 2009). Estos motivos han provocado que se inviertan en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas. En cuanto a las técnicas serológicas, se ha empleado el antígeno crudo en ELISA (Akie et al., 1998) e inmunoblot (Egwang et al., 1989). Sin embargo, estos métodos se caracterizan por su baja especificidad, principalmente por la presencia de reactividad cruzada con otras helmintosis. Con el objetivo de aumentar la especificidad se desarrollaron antígenos recombinantes, entre ellos, cabe destacar el Ll-SXP1, en el dispositivo ELISA (Klion et al., 2003) y LIPS (Burbelo et al., 2008). Además, existe comercializado un test de inmunocromatografía de flujo lateral (LFA) con el mismo antígeno, Ll-SXP1 (Pedram et al., 2017). También el ELISA que emplea el antígeno recombinante 15r3, (Azzibrouck et al., 2010) mostró unos resultados prometedores.

En cuanto a las técnicas moleculares para el diagnóstico, se ha empleado PCR convencional (Formenti et al., 2021; Jiménez et al., 2011; Nuchprayoon et al., 2005), PCR cuantitativa (Fink et al., 2011) y LAMP (del inglés, *loop-mediated isothermal amplification*) (Drame et al., 2014; Fernández-Soto et al., 2014; Poole et al., 2015; Ta-Tang et al., 2022).

#### 1.2.4. Angiostrongilosis

La angiostrongilosis humana es una enfermedad parasitaria que se transmite por el consumo de alimentos contaminados con la larva infectante (L3) del parásito. De las más de 20 especies del género *Angiostrongylus*, sólo dos producen patología en el humano, *Angiostrongylus cantonensis* y *Angiostrongylus costaricensis*. Pertenecen a la familia Angiostrongylidae, orden Strongylida, clase Chromadorea (Schoch et al., 2020). La presente tesis doctoral se va a focalizar en la especie *Angiostrongylus cantonensis*, ya que es la causante de la angiostrongilosis cerebral.

##### 1.2.4.1. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *A. cantonensis* implica a especies de mamíferos, principalmente ratas, como hospedadores definitivos y diferentes especies de moluscos como hospedadores intermediarios (Thiengo et al., 2013). El estadio adulto de *A. cantonensis* se localiza en las arterias pulmonares del hospedador definitivo (habitualmente ratas, *Rattus rattus* y *R. norvegicus*), donde la hembra deposita los huevos. Tras su eclosión la larva L1 liberada migra a la faringe y es deglutida, recorriendo el tracto gastrointestinal siendo finalmente eliminada por las heces (Bhaibulaya, 1975; Thiengo et al., 2013). Los gasterópodos de agua dulce y terrestres son los principales hospedadores intermediarios. Entre las principales especies están: *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris*, *Subulina octona*, *Pomacea canaliculata*, *Pomacea lineata*, *Deroceras laeve*... (Caldeira et al., 2007; Thiengo et al., 2010; Wallace and Rosen, 1969).

Estos se infectan bien por ingestión o por penetración directa de estas larvas L1. En el molusco, la larva L1 muda dos veces (a L2 y a L3), en un periodo de unos 20 días. Los roedores se infectan tras ingerir los hospedadores intermediarios parasitados con el estadio larvario L3, que es la fase infectante. En el hospedador definitivo las larvas L3 penetran la pared intestinal, entran en el torrente sanguíneo y, a través de circulación pulmonar, son diseminadas a diferentes órganos. La mayoría alcanza el tejido cerebral, donde mudan a L4 y posteriormente a L5 en el espacio subaracnoideo. Desde allí, los adultos jóvenes (L5) migran a las arterias pulmonares, donde se encuentran tras 25 días de la infección. En esa localización, los adultos alcanzan la madurez sexual en unos 35 días. Las larvas L1 se liberan en las heces de los roedores en aproximadamente 42 días tras la infección primaria (Thiengo et al., 2013).

“ Las larvas infectivas en el humano invaden el tejido intestinal, alcanzan la circulación sanguínea y finalmente, en aproximadamente dos semanas, alcanzan el sistema nervioso central (Wang et al., 2008). ”

Los humanos son hospedadores accidentales que se infectan tras la ingestión de moluscos o babosas, crudos o parcialmente cocinados, parasitados con las L3. También pueden infectarse por el consumo de hospedadores paraténicos parasitados como gambas, ranas, lagartijas, etc. o tras la ingestión de verduras crudas contaminadas (da Silva and Morassutti, 2021). Las larvas infectivas en el humano invaden el tejido intestinal, alcanzan la circulación sanguínea y finalmente, en aproximadamente dos semanas, alcanzan el sistema nervioso central (Wang et al., 2008). La siguiente figura representa el ciclo biológico de manera esquemática:

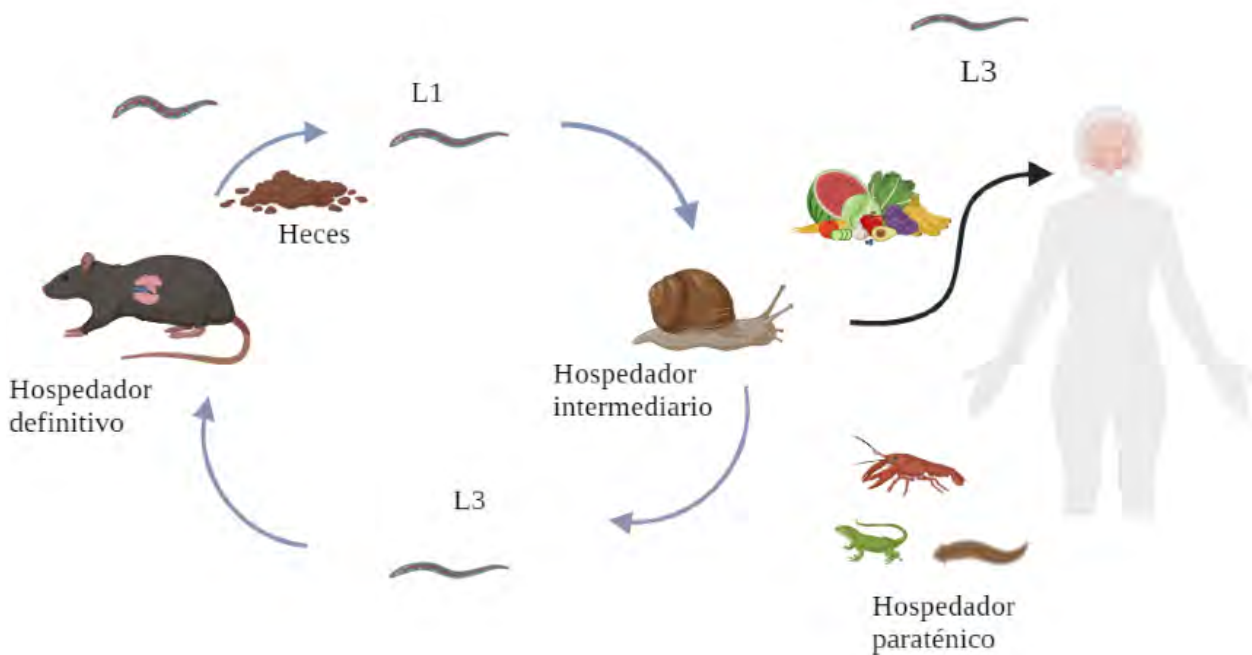


Figura 4. Ciclo biológico esquematizado de la especie *Angiostrongylus cantonesis*. L1: estadio larvario 1; L3: estadio larvario 3. Ilustración creada con Biorender®.

#### 1.2.4.2. Manifestaciones clínicas y patogénesis

La principal patología de la angiostrongilosis humana causada por *A. cantonensis* es la meningitis o meningoencefalitis eosinofílica. El tiempo de incubación de la enfermedad es variable en función del número de parásitos implicados ya que se han descrito casos desde varios días hasta varios meses tras la exposición (Wang et al., 2008). La larva no es capaz de abandonar el SNC debido a la reacción inflamatoria caracterizada por el infiltrado eosinofílico. Aunque la enfermedad puede ser asintomática o incluso se han descrito casos de desaparición espontánea de los síntomas en semanas, también existen casos con graves secuelas, desencadenando alguno en la muerte del individuo. Los principales síntomas son las cefaleas y la rigidez de cuello. Otros síntomas comunes son: visión borrosa, vómitos, náuseas, debilidad muscular, dolor retro-orbital, ataxia, dolor abdominal, convulsiones, parálisis facial, somnolencia, retención e incontinencia urinaria. En los, poco frecuentes, casos descritos de infección ocular, esta causa visión borrosa y diplopía, pudiendo desencadenar daños permanentes y pérdida de la visión (da Silva and Morassutti, 2021; Wang et al., 2008).

#### 1.2.4.3. Epidemiología

*Angiostrongylus cantonensis* es una de las principales causas de meningitis eosinofílicas en las regiones endémicas en las que se distribuye. Los principales países endémicos son Tailandia (donde la incidencia es de 2 por cada 100.000 habitantes al año), China y Australia, con una incidencia menor (Barratt et al., 2016; Federspiel et al., 2020). También son países endémicos algunas zonas del Caribe (Dorta-Contreras et al., 2007; Slom et al., 2002). Se han descrito varios brotes en China, Taiwan y Estados Unidos (Wang et al., 2008). En Europa se han reportado un total de 22 casos desde 1988 (Federspiel et al., 2020). Sin embargo, la distribución geográfica y la prevalencia de los hospedadores intermediarios ha aumentado en las últimas décadas, lo que sugiere una expansión geográfica del parásito, y, por consiguiente, un aumento en los casos humanos (Barratt et al., 2016; da Silva and Morassutti, 2021). Se han reportado casos de moluscos infectados con *A. cantonensis* en Estados Unidos (Federspiel et al., 2020; Stockdale-Walden et al., 2015; Teem et al., 2013), en concreto en la Isla de Hawai, donde actualmente la angiostrongilosis es endémica (Khamsai et al., 2023), de hecho, el parásito ha sido detectado en 16 especies de moluscos (da Silva and Morassutti, 2021). En España, también se han identificado tres especies de moluscos parasitados por *A. cantonensis* en Tenerife (Martin-Alonso et al., 2015; Segeritz et al., 2021).

#### 1.2.4.4. Diagnóstico

La identificación de las formas larvarias de *A. cantonensis* resulta compleja, debido a su localización cerebral. En el líquido cefalorraquídeo, su detección es bastante infrecuente, dada la escasa proporción de larvas que penetran en el espacio subaracnoideo, y el pequeño volumen que se obtiene de las muestras de LCR (Graeff-Teixeira et al., 2009). Debido a ello, el diagnóstico parasitológico basado en la identificación de las formas parasitarias no es el método más empleado. Las técnicas serológicas y moleculares son habitualmente las de elección (da Silva and Morassutti, 2021).

En cuanto al diagnóstico serológico, se ha empleado un test en formato ELISA con extracto crudo antigénico procedente de las hembras de *A. cantonensis* en estadio adulto, que es el test serológico de elección a nivel mundial para el diagnóstico de la patología abdominal (Ben et al., 2010; da Silva and Morassutti, 2021). Los test serológicos de la angiostrongilosis cerebral se han basado en una glicoproteína de 31 kDa obtenida en un primer momento del extracto crudo somático de las hembras adultas de *A. cantonensis*. Sin embargo, se detectó que la proteína de 31 kDa no purificada presentaba reactividad cruzada con otras parasitosis (gnathostomosis, toxocariosis, hidatidosis y strongiloidosis), especialmente relevante con aquellas que también pueden producir meningitis eosinofílicas como la gnathostomosis (Morassutti et al., 2017).

También se ha desarrollado un test de diagnóstico rápido AcQuickDx basado en la proteína purificada de 31 kDa con una especificidad mejorada (Eamsobhana et al., 2018). Recientemente se ha publicado el desarrollo de un test rápido inmunocromatográfico empleando el antígeno recombinante galectina-2 procedente del antígeno de 31 kDa que ha mostrado valores de sensibilidad y especificidad de 87% y 96,5%, respectivamente (Somboonpatarakun et al., 2020).

La técnica de diagnóstico molecular empleada es la PCR con muestras de LCR. Esta técnica puede ser especialmente útil en la fase aguda de la angiostrongilosis cerebral, cuando los anticuerpos aún no presentan niveles detectables (da Silva and Morassutti, 2021). La desventaja de las técnicas moleculares es que, en ocasiones, el ADN del parásito no está presente en la muestra o bien la concentración del mismo es inferior al límite de detección de la técnica. Se han desarrollado tanto PCRs convencionales como diferentes qPCRs (Qvarnstrom et al., 2016) que mejoran la sensibilidad de la técnica (Sears et al., 2021).

“ La desventaja de las técnicas moleculares es que, en ocasiones, el ADN del parásito no está presente en la muestra o bien la concentración del mismo es inferior al límite de detección de la técnica. ”

### 1.2.5. *Gnathostomosis*

La gnathostomosis humana es una zoonosis parasitaria que se transmite con la ingestión de alimentos contaminados. Está causada por el nematodo *Gnathostoma* spp. de la familia Gnathostomatidae, orden Rhabditida y clase Chromadorea. (Schoch et al., 2020) Los humanos adquieren la infección consumiendo alimentos crudos o poco cocinados que albergan el estadio larvario 3 avanzado de *Gnathostoma* spp. (Janwan et al., 2013). Existen múltiples especies en el género *Gnathostoma*, entre ellas *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. malaysiae* en Asia, y *G. binucleatum* en América que se han relacionado con parasitosis en humanos (Liu et al., 2020). La presente Tesis Doctoral se va a centrar en el estudio e investigación de la especie *G. spinigerum*.

#### 1.2.5.1. *Ciclo biológico*

Los principales hospedadores definitivos de *G. spinigerum*, son mamíferos silvestres o domésticos (félidos, cánidos, marsupiales...). Los parásitos adultos se encuentran en una especie de masa tumoral en la pared gástrica o del esófago formada por células hiperplásicas con exudado inflamatorio de la mucosa. Allí se produce la cópula y los huevos no embrionados se liberan a través de una apertura de la masa tumoral, para salir al exterior vehiculizados por las heces. Los huevos embrionan en ecosistemas de agua dulce a temperaturas entre 24-28°C. Tras la eclosión se libera la larva L1 que nada activamente hasta ser ingerida por el primer hospedador intermediario (diversas especies de crustáceos de los géneros *Cyclops*, *Eucyclops*, *Tropocyclops*, *Mesocyclops*...), donde se desarrolla hasta el tercer estadio larvario temprano (L3 temprana). Cuando los copépodos infectados son ingeridos por un hospedador intermediario apropiado como son los peces de agua dulce o anfibios (segundo hospedador intermediario), la L3 temprana penetra a través de la mucosa gástrica y migra hacia el músculo esquelético, donde se enquistan y se desarrolla un tercer estadio larvario avanzado (L3 avanzada, L3A). Este estadio constituye la forma infectiva en el humano, que se considera un hospedador accidental, en el que el parásito no es capaz de completar su ciclo biológico. Cuando el hospedador definitivo ingiere un hospedador intermediario infectado con las L3A se desarrollan en adultos en su estómago (Becerril, 2014; Janwan et al., 2011; Liu et al., 2020). En la figura 2.5.1 se muestra esquematizado el ciclo biológico descrito:

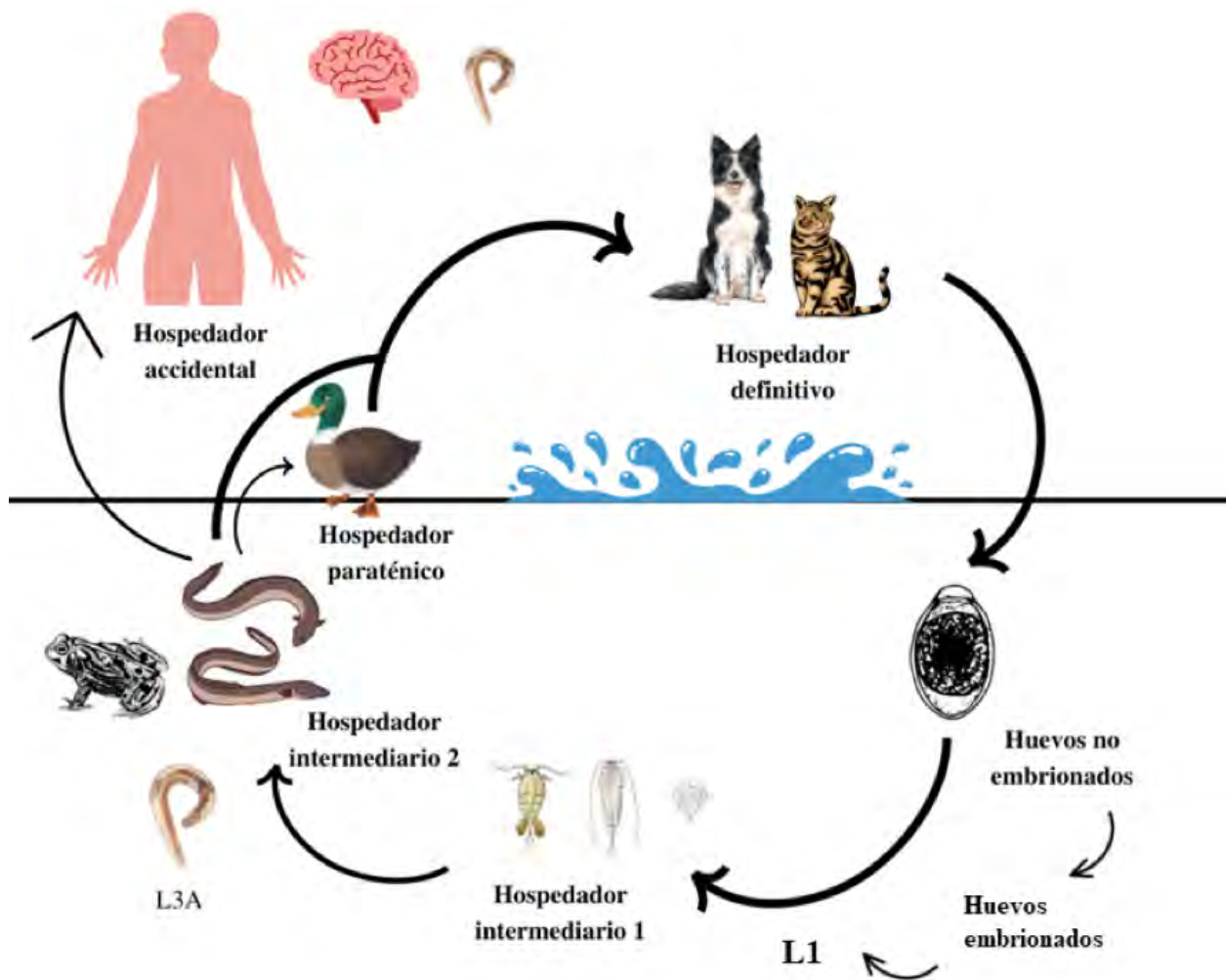


Figura 5. Ciclo biológico esquematizado de la especie *Gnathostoma spinigerum*. L3A: Larva 3 en estadio avanzado. Ilustración creada con Canva®.

Ciertas aves ictiófagas, reptiles y pequeños mamíferos, que actúan como hospedadores paraténicos, albergan la L3 en estadio avanzado, por lo que también pueden ser una vía de transmisión al humano.

Las posibles vías de transmisión de la gnathostomosis humana son: oral, transplacentaria y a través de heridas cutáneas (Lupi et al., 2015), aunque la principal vía es a través de la ingesta de alimentos procedentes de los hospedadores intermediarios infectados con la L3A (Liu et al., 2020). También se sugiere la transmisión tras la ingesta de agua contaminada con copépodos infectados (Nithiuthai et al., 2004).

### 1.2.5.2. Manifestaciones clínicas y patogénesis

Tras la ingestión de la L3A en el humano, esta se libera en el estómago, penetra a través de la mucosa gástrica e inicia el proceso migratorio hacia el hígado, provocando una sintomatología digestiva en el individuo (náuseas, vómitos, dolor epigástrico...) (Becerril, 2014; Liu et al., 2020; Rodríguez Pérez, 2013). Posteriormente, la larva puede migrar a prácticamente cualquier órgano. Los síntomas dependerán de la zona afectada; las manifestaciones varían desde cutáneas a viscerales, oculares, articulares, pulmonares, y neurológicas (Liu et al., 2020). Las manifestaciones más comunes son las cutáneas; ocasionadas por el síndrome de *larva migrans*, se producen edemas migratorios intermitentes, indurados, pruriginosos con un aumento de la temperatura en la zona (Becerril, 2014; Herman and Chiodini, 2009; Liu et al., 2020).

Las gnathostomosis de afectación cerebral (neurognathostomosis) se presentan con un cuadro de meningitis eosinofílica, con presencia de al menos 10% de eosinófilos en líquido cefalorraquídeo total (Sawanyawisuth and Chotmongkol, 2013), siendo la forma más grave de afectación visceral. Entre los principales síntomas, cabe destacar: radiculomielitis, hemorragias subaracnoideas, cefalea intensa, pérdida transitoria de los reflejos osteotendinosos en miembros inferiores, paraplejía... pudiendo llegar a desencadenar la muerte del individuo (Becerril, 2014; Diaz, 2015; Liu et al., 2020; Rodríguez Pérez, 2013; Sawanyawisuth and Chotmongkol, 2013).

La liberación de sustancias hemolíticas, enzimas proteolíticas (cisteinoproteasas y metaloproteasas) y sustancias tóxicas, así como la reacción inflamatoria y el daño mecánico producidos tras la migración de la larva, son los principales responsables del cuadro clínico en el paciente, aunque los mecanismos concretos de patogenicidad no están aún esclarecidos (Liu et al., 2020). Como resultado de la infección, se induce una respuesta inmunitaria Th2, la producción de inmunoglobulinas de las clases IgG e IgE, observando eosinofilia en un 40% de los casos (Rodríguez Pérez, 2013).

### 1.2.5.3. Epidemiología

El género *Gnathostoma* presenta una distribución global, sin embargo, la mayor parte de casos humanos de neurognathostomosis, todos ellos ocasionados por *G. spinigerum*, han sido reportados en Tailandia (Katchanov et al., 2011).

“ La enfermedad es endémica en Japón y Tailandia, aunque se han reportado casos esporádicos en varios países europeos, Australia y América, procedentes de viajeros de zonas endémicas (Herman and Chiodini, 2009). ”

La especie *G. spinigerum* se localiza en Japón, India, China y en la mayoría de los países del Sudeste Asiático (Tailandia, Laos, Myanmar, Indonesia, Malasia y Filipinas). Además, en el 2021 se ha publicado un estudio en que se identificaba la presencia de L3A en ranas y pescado de un mercado en Camboya (Sohn et al., 2021). La enfermedad es endémica en Japón y Tailandia, aunque se han reportado casos esporádicos en varios países europeos, Australia y América, procedentes de viajeros de zonas endémicas (Herman and Chiodini, 2009).

En Japón se han descrito 3.182 casos de gnathostomosis humana entre 1911 y 1995, y 73 casos entre 1996 y 2012 (Liu et al., 2020). En Tailandia, la seroprevalencia frente a *Gnathostoma* en humanos fue 62,5% (531 casos de 849 pacientes), de acuerdo a los datos publicados en el estudio retrospectivo realizado en los años 2000 y 2005 (Bussaratid et al., 2010).

Se considera una enfermedad emergente en países donde no es endémica (Herman and Chiodini, 2009). La presencia de L3A de *G. spinigerum* vivas en anguilas importadas en países no endémicos como EEUU, supone, además de una fuente potencial de infección, un riesgo de establecimiento autóctono de la enfermedad (Cole et al., 2014).

#### 1.2.5.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la gnathostomosis humana resulta complejo. Los síntomas y signos clínicos (edemas migratorios intermitentes y los niveles elevados de eosinófilos en sangre), sumado a antecedentes de haber consumido alimentos crudos en zonas endémicas, permiten sospechar de la enfermedad (Liu et al., 2020). Sin embargo, es necesario realizar un diagnóstico diferencial, puesto que algunos de los síntomas son comunes a la angiostrongilosis, triquinosis y otros nematodos relacionados con el síndrome de *larva migrans* como *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*, y *Uncinaria stenocephala* (Herman and Chiodini, 2009; Liu et al., 2020; Thiangtrongjit et al., 2021). El diagnóstico definitivo se establece tras la extirpación quirúrgica de la larva en estadio 3 avanzado (L3A) y su posterior identificación. Aunque las especies son diferenciables morfológicamente, *G. binucleatum* y *G. spinigerum* son muy parecidas, por lo que las técnicas moleculares pueden ser de ayuda para su clasificación (Berton-Ruiz et al., 2011; Cernotíková et al., 2011; Jongthawin et al., 2015).

Las técnicas de inmunodiagnóstico desarrolladas hasta el momento están basadas en: i) detección de antígeno circulante en suero siendo indicador de infección activa. Estas técnicas muestran unos valores muy bajos de sensibilidad ya que los niveles de antígeno circulantes son escasos (Chaicumpa, 2010; Thiangtrongjit et al., 2021), ii) detección de anticuerpos IgG frente a antígenos somáticos y antígenos de excreción-secreción de larva L3 indicando exposición. Con estos antígenos los valores de sensibilidad (59–87%) y especificidad (79–96%) no han sido óptimos (Maleewong et al., 1988). Se ha empleado la técnica *Western blot* detectando IgG totales con reactividad frente a la proteína de 24 kDa (Tapchaisri et al., 1991). Además, se ha conseguido obtener mejores valores diagnósticos al detectar únicamente la subclase IgG4, con una sensibilidad del 91,6% y especificidad de 87,8% (Laummanwai et al., 2007). También, se ha desarrollado un test rápido de detección de IgG4 con reactividad frente a la proteína de 24 kDa del extracto de las L3. El test puede aplicarse tanto a suero como a muestras de sangre total, por lo que esta herramienta podría ser de utilidad para el diagnóstico en campo y en la monitorización de pacientes en tratamiento. Su mayor limitante es el elevado porcentaje de reacciones cruzadas que presenta frente a otras helmintosis (Janwan et al., 2021; Wang et al., 2021). Pese a obtener los mejores resultados con el antígeno crudo procedente de las larvas, el proceso de preparación de antígeno es complejo, largo, dependiente de las condiciones ambientales y de las fuentes naturales para obtener las larvas; además, no se puede asegurar la reproducibilidad interlote (Thiangtrongjit et al., 2021).

### 1.3. TÉCNICAS DE MULTIPLEXADO BASADAS EN MBA

La técnica del multiplexado MBA, del inglés “multiplex bead assay”, es un método que permite analizar varios analitos de manera simultánea en una muestra usando microesferas. El sistema Luminex® 100/200™ se basa en los principios de la citometría de flujo, permitiendo detectar hasta 100 analitos en un único pocillo. Para ello se emplean microesferas magnéticas teñidas con una combinación de dos fluoróforos (rojo e infrarrojo) espectralmente diferentes definiendo cada set. Cada microesfera está recubierta con grupos carboxilos, que permiten acoplar diferentes analitos a las mismas mediante un enlace covalente. Estas microesferas son identificadas tras la excitación de los colorantes internos por un láser de una longitud de onda de 635 nm (láser rojo), permitiendo distinguir el set. A continuación, otro láser de 532 nm (láser verde) excita el fluoróforo correspondiente al “reporter”, que permite detectar el analito objeto de estudio en el ensayo y cuantificarlo (intensidad de fluorescencia). En la presente Tesis Doctoral, los analitos empleados han sido antígenos recombinantes de distintas especies de helmintos, que se han acoplado a diferentes sets de microesferas para la detección de anticuerpos específicos en muestras de suero humano. El “reporter” utilizado en el inmunoensayo ha sido la estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SAPE).

El hecho de permitir multiplexar un elevado número de antígenos hace que esta tecnología sea especialmente útil a nivel epidemiológico. Otra de las fortalezas de esta tecnología es la posibilidad de hacer paneles sindrómicos, en los que se analizan y cuantifican varios agentes etiológicos que causan una sintomatología similar, permitiendo un cribado rápido, dirigido y ahorrando muestra analítica. Además, permite realizar un diagnóstico más exacto al permitir la detección de varios marcadores de una misma patología, aumentando la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

En el campo de la Parasitología, esta tecnología ha sido utilizada con diferentes fines. Se ha empleado para la evaluación simultánea de múltiples candidatos para el diagnóstico serológico de la esquistosomosis (Tanigawa et al., 2015), para analizar su utilidad frente a otras tecnologías en el diagnóstico serológico de neurocisticercosis (Hernández-González et al., 2017a; Moss et al., 2018), para valorar el impacto de uso de redes mosquiteras en la carga de filariosis linfáticas y malaria (Plucinski et al., 2018) para la detección de inmunoglobulinas en el diagnóstico de tripanosomosis africana (Priest and Handali, 2021). Recientemente para evaluar la intensidad de la transmisión del paludismo y de los mecanismos de resistencia a los insecticidas en zonas endémicas (Boussougou-Sambe et al., 2022).

“ Otra de las fortalezas de esta tecnología es la posibilidad de hacer paneles sindrómicos, en los que se analizan y cuantifican varios agentes etiológicos que causan una sintomatología similar, permitiendo un cribado rápido, dirigido y ahorrando muestra analítica. ”

## 1.4. TECNOLOGÍAS DE SECUENCIACIÓN

El desarrollo del método químico de terminación de cadena por Maxam y Gilbert en 1977 (Maxam and Gilbert, 1977), seguido del método de los didesoxinucleótidos o Sanger ese mismo año (Sanger et al., 1977), permitieron realizar la secuenciación del ADN. Este último método de secuenciación fue el empleado en el Proyecto Genoma Humano, que finalizó con la publicación del genoma en 2004 (van Dijk et al., 2014). El método de Sanger se basa en la incorporación de didesoxinucleótidos terminadores de cadena mediante la ADN polimerasa. Los fragmentos de ADN resultantes se desnaturalizan por calor y se separan por tamaño empleando un gel de electroforesis (van Dijk et al., 2018). Hoy día, tras el desarrollo de las técnicas de electroforesis capilar y su automatización, la metodología de secuenciación automática de Sanger continúa siendo de gran utilidad para aquellas aplicaciones que no requieren un alto rendimiento como puede ser la secuenciación de regiones concretas de ADN, en la que se diseñan cebadores específicos, por ejemplo, para verificar construcciones de plásmidos o productos de PCR (Slatko et al., 2018a).

La secuenciación ha avanzado notablemente en las últimas décadas, y el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva han supuesto un antes y un después en el ámbito de la investigación genómica.

### 1.4.1. Secuenciación de segunda generación

La secuenciación de segunda generación o *Next Generation Sequencing* (NGS), también conocida como secuenciación masiva, permite generar millones de reacciones de secuenciación por carrera, realizando una amplificación clonal de moldes de ADN en una única celda de flujo o *flow cell*. El rendimiento de esta tecnología es tal que permite secuenciar organismos completos en cuestión de horas o pocos días en función de la longitud de su genoma.

Otra ventaja frente a la secuenciación Sanger, es que no requiere la separación electroforética de los productos secuenciados. Sumado a la disminución del precio de secuenciación, esto ha hecho de esta tecnología una herramienta clave en el campo de la biología básica, así como a nivel de la investigación clínica (van Dijk et al., 2018). Los métodos de secuenciación de segunda generación se pueden agrupar en dos categorías principales: 1) secuenciación por hibridación 2) secuenciación por síntesis. La segunda metodología, secuenciación por síntesis, es la que emplea la tecnología Illumina, siendo esta plataforma una de las líderes en la industria de la secuenciación masiva. La técnica de secuenciación de Illumina se conoce como "amplificación puente", ya que las moléculas de ADN (con un tamaño de 500bp aproximadamente), ligadas a adaptadores en cada extremo, se emplean como sustratos en las reacciones de síntesis mediante amplificación por una ADN polimerasa en un soporte sólido de vidrio, que contiene secuencias de oligonucleótidos complementarias al adaptador ligado al ADN. Los oligonucleótidos en el soporte están distribuidos espacialmente, de modo que, tras varias etapas de amplificación del ADN, se crean clústeres clonales consistentes en 1000 copias de cada fragmento de oligonucleótido. En cada soporte de vidrio se producen millones de reacciones de clúster paralelas. Durante las reacciones de síntesis, se incorporan nucleótidos modificados que se corresponden con cada una de las cuatro bases, con una etiqueta fluorescente diferente, que permite su detección e identificación. Los nucleótidos también actúan como terminadores de síntesis en cada reacción, la cual desbloquean tras su detección para la siguiente etapa de síntesis. Las reacciones se repiten durante al menos 300 veces (Slatko et al., 2018b). En función del objetivo de la secuenciación masiva, existen diferentes protocolos (secuenciación genómica, metagenómica, ADN, ARN, CHIP-seq ...), así como diferentes metodologías de preparación de librerías, y distintos equipos de secuenciación. Entre los equipos de Illumina cabe destacar NextSeq y NovaSeq. NextSeq puede proporcionar un máximo de 120 Gb con 400 millones de lecturas paired-end por carrera con una longitud de 150 pb (2x150). NovaSeq proporciona un máximo de 6000 Gb con 20 billones de lecturas paired-end por carrera con una longitud máxima de 250 pb (2x250) (Slatko et al., 2018a). Pese al enorme potencial y la gran utilidad de estas tecnologías de secuenciación de segunda generación, presentan ciertas limitaciones: una de las principales es la longitud relativamente corta de las lecturas generadas, lo cual dificulta el ensamblaje de genomas altamente repetitivos, de gran tamaño o que presentan un alto grado de complejidad.

#### 1.4.2. Secuenciación de tercera generación

La secuenciación de lecturas largas o secuenciación de tercera generación ha sido desarrollada por varias tecnologías, las dos más populares son Pacific Biosciences (PacBio) y Oxford Nanopore Technologies (ONT). PacBio desarrolló la tecnología SMRT, las siglas en inglés de 'single-molecule real-time', mientras que ONT emplea un nanoporo proteico para realizar la secuenciación (van Dijk et al., 2018). La principal diferencia con los de segunda generación es que no requiere amplificación clonal. En la tecnología de ONT, las bases del ADN se identifican mediante los cambios en la conductividad eléctrica que se generan tras el paso de la cadena de ADN a través de un poro proteico (Lu et al., 2016). La aplicación de esta tecnología ha permitido avanzar tanto en el campo de la investigación básica como a nivel clínico, ya que se ha podido realizar la secuenciación completa de pequeños genomas utilizando únicamente lecturas procedentes de la secuenciación ONT (Loman et al., 2015; Miller et al., 2018). Las principales limitaciones de la secuenciación de lecturas largas, en comparación con la secuenciación de segunda generación, son: la mayor cantidad de ADN de partida requerido para la preparación de la librería y la mayor tasa de error de las lecturas generadas (van Dijk et al., 2018). En cuanto a los dispositivos comercializados para realizar la secuenciación, el más popular es el MinION y, en el caso de requerir un mayor rendimiento, el PromethION, obteniendo un tamaño de lectura enmarcado en el rango de 10-100 kb (De Coster et al., 2019).

## 1.5. GENOMAS PUBLICADOS EN HELMINTOS

A pesar de la importancia a nivel clínica y económica de las enfermedades producidas por helmintos, la investigación genómica en estas especies presenta un desarrollo mucho menor en comparación con otros agentes etiológicos responsables de enfermedades infecciosas. Desde la publicación del genoma de referencia de la especie *Caenorhabditis elegans* en 1998, el genoma de este nematodo se ha refinado y mejorado tras numerosas actualizaciones (Davis et al., 2022). Actualmente, en la base de datos de genomas del NCBI (National Center for Biotechnology Information) ("Genome Database NCBI," 2022), tras realizar el filtrado empleando los campos "Nematoda (roundworms)" y "Reference genomes", existen 176 genomas de nematodos disponibles. Entre ellos y en relación con la temática de la presente tesis se puede descargar el genoma de *Loa loa*, cuyo tamaño es 91,37 Mb y cuya fecha de publicación fue 2012. Otro de los genomas publicados es el de *Angiostrongylus cantonensis*, con un tamaño de 293,3 Mb, publicado en 2019. En el caso del género *Gnathostoma* no existe ningún genoma publicado.

En platelmintos, tras filtrar por los campos "Platyhelminthes (flatworms)" y genoma de referencia, el número total de genomas obtenidos es 52. Entre ellos, se encuentra el genoma de *Taenia solium*, con un tamaño de 129,8 Mb, publicado en 2016.

La base de datos WormBase ParaSite también recoge los datos publicados referentes a ensamblaje, anotación y las diferentes métricas de los genomas publicados de nematodos y platelmintos ("WormBase Parasite," 2022).

### 1.5.1. Proyecto "50 genomas de helmintos"

El Instituto Wellcome Sanger del Reino Unido, en colaboración con Instituto Genómico McDonnell de la Universidad de Washington (EE. UU) y Edinburgh Genomics de la Universidad de Edimburgo, crearon el proyecto "50 genomas de helmintos" para estudiar e investigar los genomas de helmintos con mayor repercusión en enfermedades humanas, agrícolas y veterinarias. El proyecto tiene como objetivo producir borradores de genomas de las principales especies parasitarias de humanos y animales, llenar el vacío filogenético en torno a las especies de helmintos e identificar las principales diferencias entre los distintos linajes parasitarios. Fruto de este proyecto de colaboración, se publicó en el año 2019 un artículo con la mayor comparación genómica entre helmintos parásitos y no parásitos realizada hasta el momento. Combinaron 36 genomas de nematodos ya publicados con 31 nuevos ensamblajes de nematodos y 14 nuevos ensamblajes de platelmintos y con la información generada identificaron familias de genes y procesos asociados a los principales grupos parasitarios. Finalmente extrajeron los datos de más de 1,4 millones de genes para predecir nuevos fármacos y posibles dianas farmacológicas (International Helminth Genomes Consortium, 2019). Este proyecto ha permitido sentar las bases para aumentar la información genómica disponible sobre los helmintos, sin embargo, aún queda un largo camino por recorrer, especialmente en aquellas enfermedades que se consideran olvidadas. Olvidadas no porque los casos sean esporádicos, sino porque no afectan a países desarrollados, aunque no dejan de suponer la muerte de miles de individuos.

“ El proyecto tiene como objetivo producir borradores de genomas de las principales especies parasitarias de humanos y animales, llenar el vacío filogenético en torno a las especies de helmintos e identificar las principales diferencias entre los distintos linajes parasitarios. ”

## 2 BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, A., Schmidt, V., Kaminski, M., Stelzle, D., De Meijere, R., Bustos, J., Sahu, P.S., Garcia, H.H., Bobić, B., Cretu, C., Chiodini, P., Deksne, G., Dermauw, V., Devleeschauwer, B., Dorny, P., Fonseca, A., Gabriël, S., Gómez-Morales, M.A., Kucsera, I., Laranjo-González, M., Trevisan, C., Vilhena, M., Walker, N.F., Zammarchi, L., Winkler, A.S., 2020. Epidemiology and surveillance of human (neuro)cysticercosis in Europe: is enhanced surveillance required? *Trop. Med. Int. Health* 25,5, 566–578. <https://doi.org/10.1111/tmi.13384>
2. Africa, C., Refuerzo, P., Garcia, E., 1936. Further observations on the life cycle of *Gnathostoma spinigerum*. *Philipp. J. Sci.* 221–225.
3. Agudelo Higueta, N.I., Brunetti, E., McCloskey, C., 2016. Cystic Echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 54, 518–523. <https://doi.org/10.1128/JCM.02420-15>
4. Ajuh, P.M., Akue, J.P., Boutin, P., Everaere, S., Egwang, T.G., 1995. *Loa loa*: structural diversity of a 15-kDa repetitive antigen. *Exp. Parasitol.* 81, 145–153. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1103>
5. Akue, J.P., Eyang-Assengone, E.-R., Dieki, R., 2018. *Loa loa* infection detection using biomarkers: current perspectives. *Res. Rep. Trop. Med.* 9, 43–48. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S132380>
6. Akue, J.P., Hommel, M., Devaney, E., 1998. IgG subclass recognition of *Loa loa* antigens and their correlation with clinical status in individuals from Gabon. *Parasite Immunol.* 20, 387–393. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00172.x>
7. Álvarez Cáceres, R., 2007. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Díaz de Santos, Madrid, España.
8. Anderson, J.P., Rascoe, L.N., Levert, K., Chastain, H.M., Reed, M.S., Rivera, H.N., McAuliffe, I., Zhan, B., Wiegand, R.E., Hotez, P.J., Wilkins, P.P., Pohl, J., Handali, S., 2015. Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004168>
9. Azzibrouck, G.B., Akue, J.P., Lenoble, D.R., 2010. Production and immunological characterization of a recombinant subunit of a *Loa loa* polyprotein antigen. *Parasitology* 137, 1119–1128. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991740>
10. Babraham Bioinformatics, 2019. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accedido 4.26.23).
11. Barratt, J., Chan, D., Sandaradura, I., Malik, R., Spielman, D., Lee, R., Marriott, D., Harkness, J., Ellis, J., Stark, D., 2016. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology* 143, 1087–1118. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000652>
12. Bazan, R., Filho, P.T.H., Luvizutto, G.J., Nunes, H.R. de C., Odashima, N.S., Santos, A.C. dos, Júnior, J.E., Zanini, M.A., Fleury, A., Takayanagui, O.M., 2016. Clinical Symptoms, Imaging Features and Cyst Distribution in the Cerebrospinal Fluid Compartments in Patients with Extraparenchymal Neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005115. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005115>
13. Becerril, M.A., 2014. Parasitología médica, 4a. ed. McGraw-Hill, Madrid, España.
14. Belton, J.-M., McCord, R.P., Gibcus, J.H., Naumova, N., Zhan, Y., Dekker, J., 2012. Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods San Diego Calif* 58, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.05.001>
15. Ben, R., Rodrigues, R., Agostini, A.A., Graeff-Teixeira, C., 2010. Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 914–917. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000700013>
16. Bertoni-Ruiz, F., Lamothe y Argumedo, M.R., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D., León-Régagnon, V., 2011. Systematics of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in the Americas. *Rev. Mex. Biodivers.* 82, 453–464.
17. Bhaibulaya, M., 1975. Comparative studies on the life history of *Angiostrongylus mackerrasae* Bhaibulaya, 1968 and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *Int. J. Parasitol.* 5, 7–20. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90091-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90091-0)
18. Biswas, S., 2004. Inter-test comparison between filter paper absorbed blood eluate and serum for malaria serology by enzyme immunoassay: an operational feasibility. *J. Immunoassay Immunochem.* 25, 399–410. <https://doi.org/10.1081/ias-200033853>
19. Blocher, J., Schmutzhard, E., Wilkins, P.P., Gupton, P.N., Schaffert, M., Auer, H., Gotwald, T., Matuja, W., Winkler, A.S., 2011. A cross-sectional study of people with epilepsy and neurocysticercosis in Tanzania: clinical characteristics and diagnostic approaches. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1185. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001185>
20. Bonizzoni, P., Vedova, G.D., Pirola, Y., Previtali, M., Rizzi, R., 2017. FSG: Fast String Graph Construction for De Novo Assembly. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* 24, 953–968. <https://doi.org/10.1089/cmb.2017.0089>

21. Bouchaud, O., Matheron, S., Loarec, A., Dupouy Camet, J., Bourée, P., Godineau, N., Poilane, I., Cailhol, J., Caumes, E., 2020. Imported loiasis in France: a retrospective analysis of 167 cases with comparison between sub-Saharan and non sub-Saharan African patients. *BMC Infect. Dis.* 20, 63. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4740-6>
22. Boussinesq, M., 2006. Loiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100, 715–731. <https://doi.org/10.1179/136485906X112194>
23. Boussougou-Sambe, S.T., Woldearegai, T.G., Doumba-Ndalembouly, A.G., Ngossanga, B., Mba, R.B., Edoa, J.R., Zinsou, J.F., Honkpehedji, Y.J., Ngoa, U.A., Dejon-Agobé, J.C., Borrmann, S., Kreamsner, P.G., Mordmüller, B., Adegnika, A.A., 2022. Assessment of malaria transmission intensity and insecticide resistance mechanisms in three rural areas of the Moyen Ogooué Province of Gabon. *Parasit. Vectors* 15, 217. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05320-9>
24. Brizzi, K., Pelden, S., Tshokey, T., Nirola, D.K., Diamond, M.B., Klein, J.P., Tshering, L., Deki, S., Nidup, D., Bruno, V., Dorny, P., Garcia, H.H., Mateen, F.J., Bhutan Epilepsy Project, 2016. Neurocysticercosis in Bhutan: a cross-sectional study in people with epilepsy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 517–526. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw066>
25. Broad Institute, 2019. Picard Toolkit (<https://broadinstitute.github.io/picard/>).
26. Brunetti, E., Heller, T., Richter, J., Kaminstein, D., Youkee, D., Giordani, M.T., Goblirsch, S., Tamarozzi, F., 2016. Application of Ultrasonography in the Diagnosis of Infectious Diseases in Resource-Limited Settings. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 18, 6. <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0512-7>
27. Brunetti, E., Kern, P., Vuitton, D.A., Writing Panel for the WHO-IWGE, 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 114, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.001>
28. Brunetti, E., Tamarozzi, F., Macpherson, C., Filice, C., Piontek, M., Kabaalioglu, A., Dong, Y., Atkinson, N., Richter, J., Schreiber-Dietrich, D., Dietrich, C., 2018. Ultrasound and Cystic Echinococcosis. *Ultrasound Int. Open* 04, E70–E78. <https://doi.org/10.1055/a-0650-3807>
29. Burbelo, P.D., Ramanathan, R., Klion, A.D., Iadarola, M.J., Nutman, T.B., 2008. Rapid, novel, specific, high-throughput assay for diagnosis of *Loa loa* infection. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2298–2304. <https://doi.org/10.1128/JCM.00490-08>
30. Bussaratid, V., Dekumyoy, P., Desakorn, V., Jaroensuk, N., Liebtawee, B., Pakdee, W., Wattanagoon, Y., 2010. Predictive factors for *Gnathostoma seropositivity* in patients visiting the Gnathostomiasis Clinic at the Hospital for Tropical Diseases, Thailand during 2000-2005. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 41, 1316–1321.
31. Caldeira, R.L., Mendonça, C.L.G.F., Goveia, C.O., Lenzi, H.L., Graeff-Teixeira, C., Lima, W.S., Mota, E.M., Pecora, I.L., Medeiros, A.M.Z. de, Carvalho, O. dos S., 2007. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 887–889. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000700018>
32. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
33. Carabin, H., Ndimubanzi, P.C., Budke, C.M., Nguyen, H., Qian, Y., Cowan, L.D., Stoner, J.A., Rainwater, E., Dickey, M., 2011. Clinical Manifestations Associated with Neurocysticercosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001152>
34. Carmena, D., Benito, A., Eraso, E., 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop.* 98, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.02.002>
35. Cernotíková, E., Horák, A., Moravec, F., 2011. Phylogenetic relationships of some spirurine nematodes (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida: Spirurina) parasitic in fishes inferred from SSU rRNA gene sequences. *Folia Parasitol. (Praha)* 58, 135–148.
36. Chaicumpa, W., 2010. Immunodiagnosis of Gnathostomiasis. *Siriraj Med. J.* 62, 79–83.
37. Challis, R., 2016. Assembly-stats. <https://github.com/rjchallis/assembly-stats>.
38. Chen, H.-T., 1935. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis*, n. g., n. sp. des rats de Canton. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 13, 312–317. <https://doi.org/10.1051/parasite/1935134312>
39. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
40. Chen, Y., Nie, F., Xie, S.-Q., Zheng, Y.-F., Dai, Q., Bray, T., Wang, Y.-X., Xing, J.-F., Huang, Z.-J., Wang, D.-P., He, L.-J., Luo, F., Wang, J.-X., Liu, Y.-Z., Xiao, C.-L., 2021. Efficient assembly of nanopore reads via highly accurate and intact error correction. *Nat. Commun.* 12, 60. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20236-7>
41. Chesnais, C.B., Takougang, I., Paguélé, M., Pion, S.D., Boussinesq, M., 2017. Excess mortality associated with loiasis: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 108–116. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30405-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30405-4)
42. Chitanondh, H., Rosen, L., 1967. Fatal eosinophilic encephalomyelitis caused by the nematode *Gnathostoma spinigerum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 638–645. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.638>

43. Cho, T.A., 2018. Helminthic Infections of the Central Nervous System. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 24, 1489–1511. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000646>
44. Cole, R.A., Choudhury, A., Nico, L.G., Griffin, K.M., 2014. *Gnathostoma spinigerum* in live Asian swamp eels (*Monopterus* spp.) from food markets and wild populations, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 634–642. <https://doi.org/10.3201/eid2004.131566>
45. Corda, M., Sciarba, J., Blaha, J., Mahanty, S., Paredes, A., Garcia, H.H., Nash, T.E., Nutman, T.B., O’Connell, E.M., 2022. A recombinant monoclonal-based *Taenia* antigen assay that reflects disease activity in extra-parenchymal neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010442. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010442>
46. Cox, F.E.G., 2002. History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
47. Craig, P.S., Hegglin, D., Lightowers, M.W., Torgerson, P.R., Wang, Q., 2017. Echinococcosis: Control and Prevention. *Adv. Parasitol.* 96, 55–158. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.002>
48. Crestani, S., Leitolis, A., Lima, L.F.O., Krieger, M.A., Foti, L., 2016. Enhanced target-specific signal detection using an *Escherichia coli* lysate in multiplex microbead immunoassays with *E. coli*-derived recombinant antigens. *J. Immunol. Methods* 435, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.05.002>
49. CystiTeam Group for Epidemiology and Modelling of *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis, 2019. The World Health Organization 2030 goals for *Taenia solium*: Insights and perspectives from transmission dynamics modelling. *Gates Open Res.* 3. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13068.2>
50. da Silva, A.J., Morassutti, A.L., 2021. *Angiostrongylus* spp. (Nematoda; Metastrongyloidea) of global public health importance. *Res. Vet. Sci.* 135, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.023>
51. Daengsvang, S., 1949. Human Gnathostomiasis in Siam with Reference to the Method of Prevention. *J. Parasitol.* 35, 116–121. <https://doi.org/10.2307/3273112>
52. Daipert-Garcia, D., Virginio, V.G., Oliveira, F.B., Siqueira, N.G., Ferreira, H.B., Rodrigues-Silva, R., 2022. Evaluation of two heterologous recombinant antigens for the serological diagnosis of human polycystic echinococcosis. *J. Helminthol.* 96, e21. <https://doi.org/10.1017/S0022149X22000086>
53. D’Ambrosio, M.V., Bakalar, M., Bennuru, S., Reber, C., Skandarajah, A., Nilsson, L., Switz, N., Kamgno, J., Pion, S., Boussinesq, M., Nutman, T.B., Fletcher, D.A., 2015. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Sci. Transl. Med.* 7, 286re4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3480>
54. Das, A., Goyal, R., Saxena, S., Singh, N.P., 2005. Diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Indian Med. Assoc.* 103, 528–529.
55. Davis, P., Zarowiecki, M., Arnaboldi, V., Becerra, A., Cain, S., Chan, J., Chen, W.J., Cho, J., da Veiga Beltrame, E., Diamantakis, S., Gao, S., Grigoriadis, D., Grove, C.A., Harris, T.W., Kishore, R., Le, T., Lee, R.Y.N., Luybaert, M., Müller, H.-M., Nakamura, C., Nuin, P., Paulini, M., Quinton-Tulloch, M., Raciti, D., Rodgers, F.H., Russell, M., Schindelman, G., Singh, A., Stickland, T., Van Auken, K., Wang, Q., Williams, G., Wright, A.J., Yook, K., Berriman, M., Howe, K.L., Schedl, T., Stein, L., Sternberg, P.W., 2022. WormBase in 2022—data, processes, and tools for analyzing *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 220, 1–11. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac003>
56. de Almeida, S.M., Torres, L.F.B., 2011. Neurocysticercosis—retrospective study of autopsy reports, a 17-year experience. *J. Community Health* 36, 698–702. <https://doi.org/10.1007/s10900-011-9389-z>
57. De Coster, W., De Rijk, P., De Roeck, A., De Pooter, T., D’Hert, S., Strazisar, M., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., 2019. Structural variants identified by Oxford Nanopore PromethION sequencing of the human genome. *Genome Res.* 29, 1178–1187. <https://doi.org/10.1101/gr.244939.118>
58. Del Brutto, O.H., 2012. Neurocysticercosis in Western Europe: a re-emerging disease? *Acta Neurol. Belg.* 112, 335–343. <https://doi.org/10.1007/s13760-012-0068-3>
59. Del Brutto, O.H., Garcia, H.H., 2013. Neurocysticercosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 313–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00025-X>
60. Del Brutto, O.H., Nash, T.E., White, A.C., Rajshekhar, V., Wilkins, P.P., Singh, G., Vasquez, C.M., Salgado, P., Gilman, R.H., Garcia, H.H., 2017. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.* 372, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.11.045>
61. Delabre, S., Parola, P., Thiberville, D., Brouqui, P., Delmont, J., Gautret, P., 2014. Non-ophthalmological presentation of imported loiasis. *Travel Med. Infect. Dis.* 12, 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.04.012>
62. Delgado-Serra, S., Sola, J., Negre, N., Paredes-Esquivel, C., 2022. *Angiostrongylus cantonensis* Nematode Invasion Pathway, Mallorca, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 1163–1169. <https://doi.org/10.3201/eid2806.212344>
63. DeLong, E.R., DeLong, D.M., Clarke-Pearson, D.L., 1988. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837–845.

64. Dermauw, V., Carabin, H., Cissé, A., Millogo, A., Tarnagda, Z., Ganaba, R., Noh, J., Handali, S., Breen, K., Richter, V., Cissé, R., Preux, P.-M., Boncoeur-Martel, M.-P., Winkler, A.S., Van Hul, A., Dorny, P., Gabriël, S., 2018. Evaluating the Recombinant T24H Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay for the Diagnosis of Neurocysticercosis in a Panel of Samples from a Large Community-Based Randomized Control Trial in 60 Villages in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 565–569. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0541>
65. Devleeschauwer, B., Allepuz, A., Dermauw, V., Johansen, M.V., Laranjo-González, M., Smit, G.S.A., Sotiraki, S., Trevisan, C., Wardrop, N.A., Dorny, P., Gabriël, S., 2017. *Taenia solium* in Europe: Still endemic? *Acta Trop.* 165, 96–99. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.006>
66. Diaz, J.H., 2015. Gnathostomiasis: An Emerging Infection of Raw Fish Consumers in *Gnathostoma* Nematode-Endemic and Nonendemic Countries. *J. Travel Med.* 22, 318–324. <https://doi.org/10.1111/jtm.12212>
67. Dixon, M.A., Winskill, P., Harrison, W.E., Basáñez, M.-G., 2021. *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From parasite biology and immunology to diagnosis and control. *Adv. Parasitol.* 112, 133–217. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.03.003>
68. Donadeu, M., Bote, K., Gasimov, E., Kim, S., Lin, Z., Lucianez, A., Mwinzi, P., Nicholls, R., Warusavithana, S., Yajima, A., Abela-Ridder, B., 2022. WHO *Taenia solium* endemicity map – 2022 update. *Wkly. Epidemiol. Rec.*
69. Dorta-Contreras, A.J., Núñez-Fernandez, F.A., Pérez-Martín, O., Lastre-González, M., Magraner-Tarrau, M.E., Bu-Coifú Fanego, R., Noris-García, E., Padilla-Docal, B., Interián-Morales, M.T., Martínez-Delgado, J.F., Sánchez-Zulueta, E., 2007. [Peculiarities of meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in America]. *Rev. Neurol.* 45, 755–763.
70. Doyle, S.R., 2022. Improving helminth genome resources in the post-genomic era. *Trends Parasitol.* 38, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.06.002>
71. Doyle, S.R., Sankaranarayanan, G., Allan, F., Berger, D., Jimenez Castro, P.D., Collins, J.B., Crellen, T., Duque-Correa, M.A., Ellis, P., Jaleta, T.G., Laing, R., Maitland, K., McCarthy, C., Moundai, T., Softley, B., Thiele, E., Ouakou, P.T., Tushabe, J.V., Webster, J.P., Weiss, A.J., Lok, J., Devaney, E., Kaplan, R.M., Cotton, J.A., Berriman, M., Holroyd, N., 2019. Evaluation of DNA Extraction Methods on Individual Helminth Egg and Larval Stages for Whole-Genome Sequencing. *Front. Genet.* 10, 826. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00826>
72. Drame, P.M., Bennuru, S., Nutman, T.B., 2017. Discovery of Specific Antigens That Can Predict Microfilarial Intensity in *Loa loa* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2671–2678. <https://doi.org/10.1128/JCM.00513-17>
73. Drame, P.M., Fink, D.L., Kamgno, J., Herrick, J.A., Nutman, T.B., 2014. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and semiquantitative detection of *Loa loa* infection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2071–2077. <https://doi.org/10.1128/JCM.00525-14>
74. Drame, P.M., Meng, Z., Bennuru, S., Herrick, J.A., Veenstra, T.D., Nutman, T.B., 2016. Identification and Validation of *Loa loa* Microfilaria-Specific Biomarkers: a Rational Design Approach Using Proteomics and Novel Immunoassays. *mBio* 7, e02132-02115. <https://doi.org/10.1128/mBio.02132-15>
75. Eamsobhana, P., Tungtrongchitr, A., Wanachiwanawin, D., Yong, H.-S., 2018. Immunochromatographic test for rapid serological diagnosis of human angiostrongyliasis. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 73, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.06.005>
76. Eamsobhana, P., Yong, H.S., 2009. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 13, 425–431. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.09.021>
77. Eccles, D., Chandler, J., Camberis, M., Henrissat, B., Koren, S., Le Gros, G., Ewbank, J.J., 2018. De novo assembly of the complex genome of *Nippostrongylus brasiliensis* using MinION long reads. *BMC Biol.* 16, 6. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0473-4>
78. Egwang, T.G., Dupont, A., Leclerc, A., Akué, J.P., Pinder, M., 1989. Differential recognition of *Loa loa* antigens by sera of human subjects from a loiasis endemic zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 664–673. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.664>
79. European Centre for Disease Prevention and Control, E.C. for D.P. and C., 2022. Echinococcosis Annual Epidemiological Report for 2020.
80. Fabiani, S., Bruschi, F., 2013. Neurocysticercosis in Europe: Still a public health concern not only for imported cases. *Acta Trop.* 128, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.020>
81. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization), 2014. Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites: report of a Joint FAO/WHO expert meeting, 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy., Microbiological Risk Assessment Series.
82. Federspiel, F., Skovmand, S., Skarphedinsson, S., 2020. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Europe. *Int. J. Infect. Dis.* 93, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.012>

83. Fernández-Soto, P., Mvoulouga, P.O., Akue, J.P., Abán, J.L., Santiago, B.V., Sánchez, M.C., Muro, A., 2014. Development of a highly sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. *PLoS One* 9, e94664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094664>
84. Ferrer, E., Bonay, P., Foster-Cuevas, M., González, L.M., Dávila, I., Cortéz, M.M., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Gárate, T., 2007. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.12.003>
85. Fink, D.L., Kamgno, J., Nutman, T.B., 2011. Rapid molecular assays for specific detection and quantitation of *Loa loa* microfilaremia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1299. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001299>
86. Fleury, A., Hernández, M., Avila, M., Cárdenas, G., Bobes, R.J., Huerta, M., Fragoso, G., Uribe-Campero, L., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Sciuotto, E., 2007. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 970–974. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.107243>
87. Fogang, Y.F., Savadogo, A.A., Camara, M., Toffa, D.H., Basse, A., Sow, A.D., Ndiaye, M.M., 2015. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. *Int. J. Gen. Med.* 8, 333. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S73249>
88. Formenti, F., Tang, T.-H.T., Tamarozzi, F., Silva, R., La Marca, G., Pajola, B., Piubelli, C., Perandin, F., Rubio, J.M., Escolar, E.M., Bisoffi, Z., Gobbi, F., 2021. Preliminary comparison between an in-house real-time PCR vs microscopy for the diagnosis of *Loa loa* and *Mansonella perstans*. *Acta Trop.* 216, 105838. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105838>
89. Fujii, Y., Kaneko, S., Nzou, S.M., Mwau, M., Njenga, S.M., Tanigawa, C., Kimotho, J., Mwangi, A.W., Kiche, I., Matsumoto, S., Niki, M., Osada-Oka, M., Ichinose, Y., Inoue, M., Itoh, M., Tachibana, H., Ishii, K., Tsuboi, T., Yoshida, L.M., Mondal, D., Haque, R., Hamano, S., Changoma, M., Hoshi, T., ichi Kamo, K., Karama, M., Miura, M., Hirayama, K., 2014. Serological Surveillance Development for Tropical Infectious Diseases Using Simultaneous Microsphere-Based Multiplex Assays and Finite Mixture Models. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003040>
90. Galán-Puchades, M.T., Fuentes, M.V., 2013. *Taenia asiatica*: the most neglected human *Taenia* and the possibility of cysticercosis. *Korean J. Parasitol.* 51, 51–54. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.1.51>
91. Galán-Puchades, M.T., Gómez-Samblás, M., Osuna, A., Sáez-Durán, S., Bueno-Marí, R., Fuentes, M.V., 2022. Autochthonous *Angiostrongylus cantonensis* Lungworms in Urban Rats, Valencia, Spain, 2021. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 2564–2567. <https://doi.org/10.3201/eid2812.220418>
92. Garcia, A., Abel, L., Cot, M., Richard, P., Ranque, S., Feingold, J., Demeais, F., Boussinesq, M., Chippaux, J.P., 1999. Genetic epidemiology of host predisposition microfilariemia in human loiasis. *Trop. Med. Int. Health* 4, 565–574. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00442.x>
93. Garcia, H.H., Castillo, Y., Gonzales, I., Bustos, J.A., Saavedra, H., Jacob, L., Del Brutto, O.H., Wilkins, P.P., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Cysticercosis Working Group in Peru, 2018a. Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. *Trop. Med. Int. Health* 23, 101–105. <https://doi.org/10.1111/tmi.13010>
94. Garcia, H.H., Castillo, Y., Gonzales, I., Bustos, J.A., Saavedra, H., Jacob, L., Del Brutto, O.H., Wilkins, P.P., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Tsang, V.C.W., Rodriguez, S., Martinez, M., Alvarado, M., Porras, M., Vargas, V., Ccuno, A., Verastegui, M., Zimic, M., Mayta, H., Guerra, C., Castro, Y., Lopez, M.T., Gavidia, C.M., Gomez, L., Moyano, L.M., Gamboa, R., Muro, C., Vilchez, P., Nash, T.E., Mahanty, S., Noh, J., Handali, S., Friedland, J., 2018b. Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. *Trop. Med. Int. Health* 23, 101–105. <https://doi.org/10.1111/tmi.13010>
95. Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., 2020. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00085-19>
96. Garcia, H.H., O'Neal, S.E., Noh, J., Handali, S., Gilman, R.H., Gonzalez, A.E., Tsang, V.C.W., Rodriguez, S., Martinez, M., Gonzales, I., Saavedra, H., Verastegui, M., Bustos, J.A., Zimic, M., Mayta, H., Castillo, Y., Castro, Y., Lopez, M.T., Gavidia, C.M., Moyano, L.M., Gamboa, R., Muro, C., Vilchez, P., Nash, T.E., Mahanty, S., Friedland, J., 2018c. Laboratory diagnosis of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *J. Clin. Microbiol.* 56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00424-18>
97. Gardon, J., Gardon-Wendel, N., Demanga-Ngangue, null, Kamgno, J., Chippaux, J.P., Boussinesq, M., 1997. Serious reactions after mass treatment of onchocerciasis with ivermectin in an area endemic for *Loa loa* infection. *Lancet Lond. Engl.* 350, 18–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11094-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11094-1)
98. Gauci, C., Heath, D., Chow, C., Lightowlers, M.W., 2005. Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 4, 103–112. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.103>
99. GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators, 2018. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond. Engl.* 392, 1859–1922. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32335-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32335-3)

100. Genome Database NCBI [WWW Document], 2022. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/>
101. Goswami, K., Sanan-Mishra, N., 2022. Chapter 7 - RNA-seq for revealing the function of the transcriptome, in: Singh, D.B., Pathak, R.K. (Eds.), *Bioinformatics*. Academic Press, pp. 105–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00002-X>
102. Graeff-Teixeira, C., da Silva, A.C.A., Yoshimura, K., 2009. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 322–348, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-08>
103. Graeff-Teixeira, C., Sawanyawisuth, K., Lv, S., Sears, W., Rodríguez, Z.G., Álvarez, H.H., Arias, P.C., Schultz, L.K.W., Rojas, A., Jacob, J., Jarvi, S., Kramer, K., 2023. Neuroangiostrongyliasis: Updated Provisional Guidelines for Diagnosis and Case Definitions. *Pathogens* 12, 624. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040624>
104. Grau-Pujol, B., Martí-Soler, H., Escola, V., Demontis, M., Jamine, J.C., Gandasegui, J., Muchisse, O., Cambra-Pellejà, M., Cossa, A., Martínez-Valladares, M., Sacoor, C., Van Lieshout, L., Cano, J., Giorgi, E., Muñoz, J., 2021. Towards soil-transmitted helminths transmission interruption: The impact of diagnostic tools on infection prediction in a low intensity setting in Southern Mozambique. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009803. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009803>
105. Grau-Pujol, B., Massangaie, M., Cano, J., Maroto, C., Ndeve, A., Saute, F., Muñoz, J., 2019. Frequency and distribution of neglected tropical diseases in Mozambique: a systematic review. *Infect. Dis. Poverty* 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0613-x>
106. Grosso, G., Gruttadauria, S., Biondi, A., Marventano, S., Mistretta, A., 2012. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J. Gastroenterol.* 18, 1425–1437. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i13.1425>
107. Grove, D., 1991. *A History of Human Helminthology*. C·A·B International: Wallingford, UK.
108. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
109. Hancock, K., Khan, A., Williams, F.B., Yushak, M.L., Patabhi, S., Noh, J., Tsang, V.C.W., 2003. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2577–2586. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2577-2586.2003>
110. Hancock, K., Patabhi, S., Whitfield, F.W., Yushak, M.L., Lane, W.S., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Tsang, V.C.W., 2006. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.02.004>
111. Herman, J.S., Chiodini, P.L., 2009. Gnathostomiasis, Another Emerging Imported Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 484–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-09>
112. Hernández, M., Gonzalez, L.M., Fleury, A., Saenz, B., Parkhouse, R.M.E., Harrison, L.J.S., Garate, T., Sciuotto, E., 2008. Neurocysticercosis: detection of *Taenia solium* DNA in human cerebrospinal fluid using a semi-nested PCR based on HDP2. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102, 317–323. <https://doi.org/10.1179/136485908X278856>
113. Hernández-González, A., Muro, A., Barrera, I., Ramos, G., Orduña, A., Siles-Lucas, M., 2008. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 15, 147–153. <https://doi.org/10.1128/CVI.00363-07>
114. Hernández-González, A., Noh, J., Perteguer, M.J., Gárate, T., Handali, S., 2017a. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasit. Vectors* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2160-2>
115. Hernández-González, A., Noh, J., Perteguer, M.J., Gárate, T., Handali, S., 2017b. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasit. Vectors* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2160-2>
116. Hernández-González, A., Sánchez-Ovejero, C., Manzano-Román, R., González Sánchez, M., Delgado, J.M., Pardo-García, T., Soriano-Gálvez, F., Akhan, O., Cretu, C.M., Vutova, K., Tamarozzi, F., Mariconti, M., Brunetti, E., Vola, A., Fabiani, M., Casulli, A., Siles-Lucas, M., 2018. Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006741>
117. Hernández-González, A., Santivañez, S., García, H.H., Rodríguez, S., Muñoz, S., Ramos, G., Orduña, A., Siles-Lucas, M., 2012. Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001714>
118. Herrador, Z., Siles-Lucas, M., Aparicio, P., Lopez-Velez, R., Gherasim, A., Garate, T., Benito, A., 2016. Cystic Echinococcosis Epidemiology in Spain Based on Hospitalization Records, 1997-2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004942. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004942>
119. Herrick, J.A., Legrand, F., Gounoue, R., Nchinda, G., Montavon, C., Bopda, J., Tchana, S.M., Ondigui, B.E., Nguluwe, K., Fay, M.P., Makiya, M., Metenou, S., Nutman, T.B., Kamgno, J., Klion, A.D., 2017. Posttreatment Reactions After Single-Dose Diethylcarbamazine or Ivermectin in Subjects With *Loa loa* Infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 64, 1017–1025. <https://doi.org/10.1093/cid/cix016>

120. Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Navarrete, I., Sanmartín, M.L., 1996. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.* 82, 378–381. <https://doi.org/10.1007/s004360050131>
121. Instituto Nacional de Estatística (INE), 2019. Resultado do Censo Populacional 2017 [WWW Document]. Inst. Nac. Estat. INE Mozamb. URL [https://www.ine.gov.mz/senso-2017/-/document\\_library/pfpz/view/443367?\\_com\\_liferay\\_document\\_library\\_web\\_portlet\\_DLPortlet\\_INSTANCE\\_pfpz\\_redirect=http%3A%2F%2Flocal-host%3A8080%2Fsenso-2017%3Fp\\_id%3Dcom\\_liferay\\_document\\_library\\_web\\_portlet\\_DLPortlet\\_INSTANCE\\_pfpz%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview](https://www.ine.gov.mz/senso-2017/-/document_library/pfpz/view/443367?_com_liferay_document_library_web_portlet_DLPortlet_INSTANCE_pfpz_redirect=http%3A%2F%2Flocal-host%3A8080%2Fsenso-2017%3Fp_id%3Dcom_liferay_document_library_web_portlet_DLPortlet_INSTANCE_pfpz%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview) (accessed 6.28.23).
122. International Helminth Genomes Consortium, 2019. Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nat. Genet.* 51, 163–174. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0262-1>
123. International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
124. Ishida, M.M.I., Rubinsky-Elefant, G., Ferreira, A.W., Hoshino-Shimizu, S., Vaz, A.J., 2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop.* 89, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.09.005>
125. Janwan, P., Intapan, P.M., Sadaow, L., Rodpai, R., Yamasaki, H., Boonroumkaew, P., Sanpool, O., Thanchomnang, T., Sadee, P., Maleewong, W., 2021. Development of Immunochromatographic Test Kit for Rapid Detection of Specific IgG4 Antibody in Whole-Blood Samples for Diagnosis of Human Gnathostomiasis. *Diagn. Basel Switz.* 11, 862. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050862>
126. Janwan, P., Intapan, P.M., Sanpool, O., Sadaow, L., Thanchomnang, T., Maleewong, W., 2011. Growth and development of *Gnathostoma spinigerum* (Nematoda: Gnathostomatidae) larvae in *Mesocyclops aspericornis* (Cyclopoida: Cyclopidae). *Parasit. Vectors* 4, 93. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-93>
127. Janwan, P., Intapan, P.M., Yamasaki, H., Laummaunwai, P., Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Tayapiwatana, C., Kitkhuandee, A., Lulitanond, V., Nawa, Y., Maleewong, W., 2013. Application of Recombinant *Gnathostoma spinigerum* Matrix Metalloproteinase-Like Protein for Serodiagnosis of Human Gnathostomiasis by Immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 63–67. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0617>
128. Janwan, P., Intapan, P.M., Yamasaki, H., Rodpai, R., Laummaunwai, P., Thanchomnang, T., Sanpool, O., Kobayashi, K., Takayama, K., Kobayashi, Y., Maleewong, W., 2016. Development and usefulness of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human gnathostomiasis. *Parasit. Vectors* 9, 14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1294-y>
129. Ji, S., Jw, N., 2018. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Brief. Bioinform.* 19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw096>
130. Jiménez, M., González, L., Bailo, B., Prieto, I., Iborra, A., Sima, A., Cano, J., Sánchez, I., Gárate, T., 2009. A pilot study on the prevalence of loiasis in Equatorial Guinea using an accurate Nested PCR. *Enfermedades Emerg.* 11, 16–21.
131. Jiménez, M., González, L.M., Carranza, C., Bailo, B., Pérez-Ayala, A., Muro, A., Pérez-Arellano, J.L., Gárate, T., 2011. Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. *Exp. Parasitol.* 127, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.019>
132. Jiménez, S., Pérez, A., Gil, H., Schantz, P., Ramalle, E., Juste, R., 2002. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. *Acta Trop.* 83, 213–221. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00091-8](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00091-8)
133. Johnson, O., Giorgi, E., Fronterre, C., Amoah, B., Atsame, J., Ella, S.N., Biamonte, M., Ogoussan, K., Hundley, L., Gass, K., Diggle, P.J., 2022. Geostatistical modelling enables efficient safety assessment for mass drug administration with ivermectin in *Loa loa* endemic areas through a combined antibody and LoaScope testing strategy for elimination of onchocerciasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010189. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010189>
134. Jongthawin, J., Intapan, P.M., Sanpool, O., Sadaow, L., Janwan, P., Thanchomnang, T., Sangchan, A., Visaetsilpanonta, S., Keawkong, W., Maleewong, W., 2015. Three Human Gnathostomiasis Cases in Thailand with Molecular Identification of Causative Parasite Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 615–618. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0284>
135. Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., Yabana, M., Harada, M., Nagayasu, E., Maruyama, H., Kohara, Y., Fujiyama, A., Hayashi, T., Itoh, T., 2014. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.* 24, 1384–1395. <https://doi.org/10.1101/gr.170720.113>
136. Karshima, S.N., Ahmed, M.I., Adamu, N.B., Magaji, A.A., Zakariah, M., Mohammed, K., 2022. Africa-wide meta-analysis on the prevalence and distribution of human cystic echinococcosis and canine *Echinococcus granulosus* infections. *Parasit. Vectors* 15, 357. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05474-6>
137. Katchanov, J., Sawanyawisuth, K., Chotmongkol, V., Nawa, Y., 2011. Neurognathostomiasis, a Neglected Parasitosis of the Central Nervous System. *Emerg. Infect. Dis. J. - CDC* 17. <https://doi.org/10.3201/eid1707101433>

138. Katti, M.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S., 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1161–1167. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903>
139. Kaunitz, J.D., 2015. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig. Dis. Sci.* 60, 2230–2231. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>
140. Kaur, R., Arora, N., Rawat, S.S., Keshri, A.K., Sharma, S.R., Mishra, A., Singh, G., Prasad, A., 2021. Vaccine for a neglected tropical disease *Taenia solium* cysticercosis: fight for eradication against all odds. *Expert Rev. Vaccines* 20, 1447–1458. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1967750>
141. Kern, P., Menezes da Silva, A., Akhan, O., Müllhaupt, B., Vizcaychipi, K.A., Budke, C., Vuitton, D.A., 2017. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv. Parasitol.* 96, 259–369. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.006>
142. Khamsai, S., Howe, K., Sawanyawisuth, K., 2023. Clinical Characteristics of Long-Term Complications of Severe Rat Lung Worm Disease in Hawai'i: A Survey of 4 Cases. *Hawaii J. Health Soc. Welf.* 82, 107–111.
143. Khamsai, S., Sawanyawisuth, K., Senthong, V., Limpawattana, P., Chindapasirt, J., Maleewong, W., Tiamkao, S., Chotmongkol, V., 2021. Predictive models for *Angiostrongylus cantonensis* and *Gnathostoma spinigerum* infection in pathologically or serologically proved eosinophilic meningitis. *Am. J. Transl. Res.* 13, 10413–10420.
144. Khumbatta, M., Firozgary, B., Tweardy, D.J., Weinstock, J., Firozgary, G., Bhatena, Z., Bulsara, T., Siller, R., Robinson, P., 2014. Somatostatin negatively regulates parasite burden and granulomatous responses in cysticercosis. *BioMed Res. Int.* 2014, 247182. <https://doi.org/10.1155/2014/247182>
145. Kittur, N., King, C.H., Campbell, C.H., Kinung'hi, S., Mwinzi, P.N.M., Karanja, D.M.S., N'Goran, E.K., Phillips, A.E., Gazzinelli-Guimaraes, P.H., Olsen, A., Magnussen, P., Secor, W.E., Montgomery, S.P., Utzinger, J., Walker, J.W., Binder, S., Colley, D.G., 2019. Persistent Hotspots in Schistosomiasis Consortium for Operational Research and Evaluation Studies for Gaining and Sustaining Control of Schistosomiasis after Four Years of Mass Drug Administration of Praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 101, 617–627. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0193>
146. Klion, A.D., Vijaykumar, A., Oei, T., Martin, B., Nutman, T.B., 2003. Serum immunoglobulin G4 antibodies to the recombinant antigen, Ll-SXP-1, are highly specific for *Loa loa* infection. *J. Infect. Dis.* 187, 128–133. <https://doi.org/10.1086/345873>
147. Knott, J., 1939. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33, 191–196. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(39\)90101-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(39)90101-X)
148. Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., Pevzner, P.A., 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 37, 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
149. Langa, I., Padama, F., Nhancupe, N., Pondja, A., Hlshwayo, D., Gouveia, L., Stelzle, D., da Costa, C.P., Schmidt, V., Winkler, A.S., Noormahomed, E.V., 2022. The burden of *T. solium* cysticercosis and selected neuropsychiatric disorders in Mocuba district, Zambézia province, Mozambique. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010606. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010606>
150. Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
151. Larrieu, E., Gavidia, C.M., Lightowers, M.W., 2019. Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. *Zoonoses Public Health* 66, 889–899. <https://doi.org/10.1111/zph.12649>
152. Laummaunwai, P., Intapan, P.M., Wongkham, C., Lulitanond, V., Tayapiwatana, C., Maleewong, W., 2010. *Gnathostoma spinigerum*: molecular cloning, expression and characterization of the cyclophilin protein. *Exp. Parasitol.* 126, 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.004>
153. Laummaunwai, P., Sawanyawisuth, K., Intapan, P.M., Chotmongkol, V., Wongkham, C., Maleewong, W., 2007. Evaluation of human IgG class and subclass antibodies to a 24 kDa antigenic component of *Gnathostoma spinigerum* for the serodiagnosis of gnathostomiasis. *Parasitol. Res.* 101, 703–708. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0538-3>
154. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
155. Liance, M., Janin, V., Bresson-Hadni, S., Vuitton, D.A., Houin, R., Piarroux, R., 2000. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: Confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3718–3721. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3718-3721.2000>
156. Lightowers, M.W., 2013. Cysticercosis and echinococcosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 365, 315–335. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_234](https://doi.org/10.1007/82_2012_234)
157. Liu, G.-H., Shao, R., Cai, X.-Q., Li, W.-W., Zhu, X.-Q., 2015. *Gnathostoma spinigerum* Mitochondrial Genome Sequence: a Novel Gene Arrangement and its Phylogenetic Position within the Class Chromadorea. *Sci. Rep.* 5, 12691. <https://doi.org/10.1038/srep12691>

158. Liu, G.-H., Sun, M.-M., Elsheikha, H.M., Fu, Y.-T., Sugiyama, H., Ando, K., Sohn, W.-M., Zhu, X.-Q., Yao, C., 2020. Human gnathostomiasis: a neglected food-borne zoonosis. *Parasit. Vectors* 13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04494-4>
159. Liu, J., Tao, J., Chen, W., Wang, T., Chen, X., Shen, M., Ou, Q., Zhang, Y., Ding, Y., Wu, J., Cheng, X., Lu, G., Yan, G., 2022. The application of metagenomic next-generation sequencing for *Angiostrongylus eosinophilic meningitis* in a pediatric patient: A case report. *Front. Public Health* 10, 1003013. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1003013>
160. Loman, N.J., Quick, J., Simpson, J.T., 2015. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat. Methods* 12, 733–735. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>
161. Lopez-Bernus, A., Belhassen-García, M., Carpio-Perez, A., Perez Del Villar, L., Romero-Alegria, A., Velasco-Tirado, V., Muro, A., Pardo-Lledias, J., Cordero-Sánchez, M., Alonso-Sardón, M., 2015. Is cystic echinococcosis re-emerging in western Spain? *Epidemiol. Infect.* 143, 3351–3357. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000618>
162. Lu, H., Giordano, F., Ning, Z., 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
163. Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Yunjie, Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Yong, Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D.W., Yiu, S.-M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, Jian, Lam, T.-W., Wang, Jun, 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience* 1, 18. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>
164. Lupi, O., Downing, C., Lee, M., Pino, L., Bravo, F., Giglio, P., Sethi, A., Klaus, S., Sanguenza, O.P., Fuller, C., Mendoza, N., Ladizinski, B., Woc-Colburn, L., Tyring, S.K., 2015. Mucocutaneous manifestations of helminth infections: Nematodes. *J. Am. Acad. Dermatol.* 73, 929–944; quiz 945–946. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.11.034>
165. Mackerras, M.J., Sandars, D.F., 1954. Life-history of the Rat Lung-worm and its Migration through the Brain of its Host. *Nature* 173, 956–957. <https://doi.org/10.1038/173956a0>
166. Maek-A-Nantawat, W., Bussaratid, V., Phonrat, B., Pakdee, W., Nuamtanong, S., Dekumyoy, P., 2014. Diagnosis of gnathostomiasis by skin testing using partially purified specific antigen and total IgE levels. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108, 71–76. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt118>
167. Maksimov, P., Bergmann, H., Wassermann, M., Romig, T., Gottstein, B., Casulli, A., Conraths, F.J., 2020. Species Detection within the *Echinococcus granulosus sensu lato* Complex by Novel Probe-Based Real-Time PCRs. *Pathogens* 9, 791. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100791>
168. Maleewong, W., Morakote, N., Thamasonthi, W., Charuchinda, K., Tesana, S., Khamboonruang, C., 1988. Serodiagnosis of human gnathostomiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 19, 201–205.
169. Manson, P., 1891. The filaria sanguinis hominis major and minor, two new species of hæmatozoa. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 3514 137, 4–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)15666-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)15666-2)
170. Marçais, G., Kingsford, C., 2011. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 764–770. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011>
171. Marcelo Gálvez, M., 2013. Algunos hitos históricos en el desarrollo del diagnóstico médico por imágenes. *Rev. Médica Clínica Las Condes* 24, 5–13. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70123-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70123-8)
172. Mariconti, M., Bazzocchi, C., Tamarozzi, F., Meroni, V., Genco, F., Maserati, R., Brunetti, E., 2014. Immunoblotting with human native antigen shows stage-related sensitivity in the serodiagnosis of hepatic cystic echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 75–79. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0341>
173. Martin-Alonso, A., Abreu-Yanes, E., Feliu, C., Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valladares, B., Foronda, P., 2015. Intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Tenerife, Spain. *PloS One* 10, e0120686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120686>
174. Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 560–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
175. McVeigh, P., 2020. Post-genomic progress in helminth parasitology. *Parasitology* 147, 835–840. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000591>
176. Melki, J., Koffi, E., Boka, M., Touré, A., Soumahoro, M.-K., Jambou, R., 2018. *Taenia solium* cysticercosis in West Africa: status update. *Parasite Paris Fr.* 25, 49. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018048>
177. Melo, L.C.V. de, Souza, F.C.R. de, Baccin, A. de O., Mota, D.J.G. da, Pereira-Chioccola, V.L., Pinto, P.L.S., 2022. Immunoanalysis of different antigenic preparations of *Angiostrongylus cantonensis* for neuroangiostrongyliasis diagnosis improvement. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117, e220086. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220086>
178. Melrose, W.D., Turner, P.F., Pisters, P., Turner, B., 2000. An improved Knott's concentration test for the detection of microfilariae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 176. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90266-9](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90266-9)
179. Metzger, W.G., Mordmüller, B., 2014a. Loa loa—does it deserve to be neglected? *Lancet Infect. Dis.* 14, 353–357. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70263-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70263-9)

180. Metzger, W.G., Mordmüller, B., 2014b. Loa loa-does it deserve to be neglected? *Lancet Infect. Dis.* 14, 353–357. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70263-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70263-9)
181. Miller, D.E., Staber, C., Zeitlinger, J., Hawley, R.S., 2018. Highly Contiguous Genome Assemblies of 15 *Drosophila* Species Generated Using Nanopore Sequencing. *G3 Bethesda Md* 8, 3131–3141. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200160>
182. Montenegro, T., Gilman, R.H., Castillo, R., Tsang, V., Brandt, J., Guevara, A., Sanabria, H., Verastegui, M., Sterling, C., Miranda, E., 1994. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 36, 327–334. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651994000400005>
183. Montero, E., Montero, J., Rosales, M.J., Mascaró, C., 2001. Human gnathostomosis in Spain: first report in humans. *Acta Trop.* 78, 59–62. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00168-6)
184. Morassutti, A.L., Levert, K., Perelygin, A., da Silva, A.J., Wilkins, P., Graeff-Teixeira, C., 2012. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 12, 961–968. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0957>
185. Morassutti, A.L., Rascoe, L.N., Handali, S., DA Silva, A.J., Wilkins, P.P., Graeff-Teixeira, C., 2017. Cross-reactivity of the 31 kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* - Dealing with the immunodiagnosis of meningoencephalitis. *Parasitology* 144, 459–463. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001918>
186. Morgan, C., Bowling, M., Bartram, J., Lyn Kayser, G., 2017. Water, sanitation, and hygiene in schools: Status and implications of low coverage in Ethiopia, Kenya, Mozambique, Rwanda, Uganda, and Zambia. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220, 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.03.015>
187. Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>
188. Moss, D.M., Handali, S., Chard, A.N., Trinies, V., Bullard, S., Wiegand, R.E., Doumbia, S., Freeman, M.C., Lammie, P.J., 2018. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Taenia solium* cysticercosis antigen glutathione-s-Transferase-rT24H in Malian children using multiplex bead assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 1408–1412. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0310>
189. Murphy, G.S., Johnson, S., 2013. Clinical Aspects of Eosinophilic Meningitis and Meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm. *Hawaii J. Med. Public Health* 72, 35–40.
190. Ndzeshang, L.B., Fombad, F.F., Njouendou, A.J., Chunda, V.C., Gandjui, N.V.T., Akumtoh, D.N., Chounna, P.W.N., Steven, A., Pionnier, N.P., Layland, L.E., Ritter, M., Hoerauf, A., Taylor, M.J., Turner, J.D., Wanji, S., 2020. Generation of *Loa loa* infective larvae by experimental infection of the vector, *Chrysops silacea*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008415. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008415>
191. Nithiuthai, S., Anantaphruti, M.T., Waikagul, J., Gajadhar, A., 2004. Waterborne zoonotic helminthiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 167–193. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.018>
192. Noormahomed, E.V., Nhacupe, N., Mascaró-Lazcano, C., Mauaie, M.N., Buene, T., Fuzamo, C.A., Benson, C.A., 2014. A Cross-sectional Serological Study of Cysticercosis, Schistosomiasis, Toxocariasis and Echinococcosis in HIV-1 Infected People in Beira, Mozambique. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3121. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003121>
193. Nuamtanong, S., 1996. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 27, 291–296.
194. Nuamtanong, S., Reamtong, O., Phuphisut, O., Chotsiri, P., Malaitong, P., Dekumyoy, P., Adisakwattana, P., 2019. Transcriptome and excretory-secretory proteome of infective-stage larvae of the nematode *Gnathostoma spinigerum* reveal potential immunodiagnostic targets for development. *Parasite Paris Fr.* 26, 34. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019033>
195. Nuchprayoon, S., Junpee, A., Poovorawan, Y., Scott, A.L., 2005. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 895–900.
196. O'Connell, E.M., Harrison, S., Dahlstrom, E., Nash, T., Nutman, T.B., 2020a. A Novel, Highly Sensitive Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Subarachnoid and Ventricular Neurocysticercosis and for Assessing Responses to Treatment. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 70, 1875–1881. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz541>
197. O'Connell, E.M., Harrison, S., Dahlstrom, E., Nash, T., Nutman, T.B., 2020b. A Novel, Highly Sensitive Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Subarachnoid and Ventricular Neurocysticercosis and for Assessing Responses to Treatment. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 70, 1875–1881. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz541>
198. Ohiolei, J.A., Yan, H.-B., Li, L., Zhu, G.-Q., Muku, R.J., Wu, Y.-T., Jia, W.-Z., 2020. Review of Cystic Echinococcosis in Nigeria: A Story of Neglect. *Acta Parasitol.* 65, 1–10. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00124-x>

199. Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M., 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12, 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
200. Ouma, E., Dione, M., Mtimet, N., Lule, P., Colston, A., Adedirán, S., Grace, D., 2021. Demand for *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: Lessons and Insights From the Pig Production and Trading Nodes of the Uganda Pig Value Chain. *Front. Vet. Sci.* 8, 611166. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611166>
201. Padgett, J.J., Jacobsen, K.H., 2008. Loiasis: African eye worm. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 983–989. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.022>
202. Pedram, B., Pasquetto, V., Drame, P.M., Ji, Y., Gonzalez-Moa, M.J., Baldwin, R.K., Nutman, T.B., Biamonte, M.A., 2017. A novel rapid test for detecting antibody responses to *Loa loa* infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005741. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005741>
203. Pevzner, P.A., Tang, H., Waterman, M.S., 2001. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9748–9753. <https://doi.org/10.1073/pnas.171285098>
204. Pinder, M., Dupont, A., Egwang, T.G., 1988. Identification of a surface antigen on *Loa loa* microfilariae the recognition of which correlates with the amicrofilaremic state in man. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 141, 2480–2486.
205. Plucinski, M.M., Candrinho, B., Chambe, G., Muchanga, J., Muguande, O., Matsinhe, G., Mathe, G., Rogier, E., Doyle, T., Zulliger, R., Colborn, J., Saifodine, A., Lammie, P., Priest, J.W., 2018. Multiplex serology for impact evaluation of bed net distribution on burden of lymphatic filariasis and four species of human malaria in northern Mozambique. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006278. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006278>
206. Poole, C.B., Ettwiller, L., Tanner, N.A., Evans, T.C., Wanji, S., Carlow, C.K.S., 2015. Genome Filtering for New DNA Biomarkers of *Loa loa* Infection Suitable for Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One* 10, e0139286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139286>
207. Prats, G., 2012. *Microbiología y parasitología médicas*, 1a. ed. Médica Paramericana, DL, Madrid, España.
208. Pravettoni, V., Primavesi, L., Piantanida, M., 2012. *Anisakis simplex*: current knowledge. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 44, 150–156.
209. Priest, J.W., Handali, S., 2021. Multiplex Bead Assay for the Detection of Human IgG Antibody Responses to African Trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 105, 1193–1197. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0479>
210. Prijbelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 70, e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
211. Proaño-Narvaez, J.V., Meza-Lucas, A., Mata-Ruiz, O., García-Jerónimo, R.C., Correa, D., 2002. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2115–2118. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2115-2118.2002>
212. Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F.M., Cuéllar, C., 2008. *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp. Parasitol.* 118, 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.07.002>
213. Puente, S., Ramírez-Olivencia, G., Lago, M., Subirats, M., Bru, F., Pérez-Blázquez, E., Arsuaga, M., de Guevara, C.L., de la Calle-Prieto, F., Vicente, B., Alonso-Sardón, M., Bellhassen-García, M., Muro, A., 2020. Loiasis in sub-Saharan migrants living in Spain with emphasis of cases from Equatorial Guinea. *Infect. Dis. Poverty* 9, 16. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0627-4>
214. Qvarnstrom, Y., Xayavong, M., da Silva, A.C.A., Park, S.Y., Whelen, A.C., Calimlim, P.S., Sciulli, R.H., Honda, S.A.A., Higa, K., Kitsutani, P., Chea, N., Heng, S., Johnson, S., Graeff-Teixeira, C., Fox, L.M., da Silva, A.J., 2016. Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of *Angiostrongylus cantonensis* DNA in Cerebrospinal Fluid from Patients with Eosinophilic Meningitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 176–181. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0146>
215. Raibagkar, P., Berkowitz, A.L., 2018. The Many Faces of Neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.* 390, 75–76. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.04.018>
216. Rajshekhar, V., 2018. Evolution of concepts in the management of cysticercosis of the brain: Then (1970) and now (2018). *Neurol. India* 66, 919–927. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.236969>
217. Rodríguez Pérez, Elba.G., 2013. *Parasitología médica*, 1a. ed. El Manual Moderno, México D.F, Mexico.
218. Rodriguez, S., Dorny, P., Tsang, V.C.W., Pretell, E.J., Brandt, J., Lescano, A.G., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Garcia, H.H., Cysticercosis Working Group in Peru, 2009. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J. Infect. Dis.* 199, 1345–1352. <https://doi.org/10.1086/597757>
219. Rogier, E., Van Den Hoogen, L., Herman, C., Gurralla, K., Joseph, V., Stresman, G., Presume, J., Romilus, I., Mondelus, G., Elisme, T., Ashton, R., Chang, M., Lemoine, J.F., Druetz, T., Eisele, T.P., Existe, A., Boncy, J., Drakeley, C., Udhayakumar, V., 2019. High-throughput malaria serosurveillance using a one-step multiplex bead assay. *Malar. J.* 18, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3027-0>

220. Rosen, L., Chappell, R., Laqueur, G.L., Wallace, G.D., Weinstein, P.P., 1962. Eosinophilic meningoencephalitis caused by a metastrongylid lung-worm of rats. *JAMA* 179, 620–624. <https://doi.org/10.1001/jama.1962.03050080032007>
221. Rosenblatt, J.E., 2009. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 49, 1103–1108. <https://doi.org/10.1086/605574>
222. Rott, M.B., Fernández, V., Farias, S., Ceni, J., Ferreira, H.B., Haag, K.L., Zaha, A., 2000. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop.* 75, 331–340. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00069-3](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00069-3)
223. Salazar Schettino, P.M., Cabrera Bravo, M., 2014. Capítulo 21. Hidatidosis., in: *Parasitología Médica*. McGraw-Hill, Madrid, España, pp. 187–210.
224. Sánchez-Ovejero, C., Akdur, E., Manzano-Román, R., Hernández-González, A., González-Sánchez, M., Becerro-Recio, D., González-Miguel, J., Akhan, O., Cretu, C.M., Vutova, K., Tamarozzi, F., Mariconti, M., Brunetti, E., Vola, A., Fabiani, M., Casulli, A., Siles-Lucas, M., 2020. Evaluation of the sensitivity and specificity of GST-tagged recombinant antigens 2B2t, Ag5t and DIPOL in ELISA for the diagnosis and follow up of patients with cystic echinococcosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008892>
225. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
226. Santivanez, S., Garcia, H.H., 2010. Pulmonary cystic echinococcosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 16, 257–261. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283386282>
227. Sawanyawisuth, K., Chotmongkol, V., 2013. Eosinophilic meningitis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 207–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00015-7>
228. Schoch, C.L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O’Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database J. Biol. Databases Curation* 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
229. Sears, W.J., Qvarnstrom, Y., Dahlstrom, E., Snook, K., Kaluna, L., Baláz, V., Feckova, B., Šlapeta, J., Modry, D., Jarvi, S., Nutman, T.B., 2021. AcanR3990 qPCR: A Novel, Highly Sensitive, Bioinformatically-Informed Assay to Detect *Angiostrongylus cantonensis* Infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 73, e1594–e1600. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1791>
230. Seesao, Y., Audebert, C., Verrez-Bagnis, V., Merlin, S., Jérôme, M., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C.M., Gay, M., 2014. Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of Anisakidae nematodes. *J. Microbiol. Methods* 102, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.004>
231. Segeritz, L., Cardona, A., Taubert, A., Hermosilla, C., Ruiz, A., 2021. Autochthonous *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Aelurostrongylus abstrusus* infections in native terrestrial gastropods from the Macaronesian Archipelago of Spain. *Parasitol. Res.* 120, 2671–2680. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07203-x>
232. Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F.J., Müller, N., 2017. Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Adv. Parasitol.* 96, 159–257. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.003>
233. Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
234. Simpson, J.T., Durbin, R., 2012. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. *Genome Res.* 22, 549–556. <https://doi.org/10.1101/gr.126953.111>
235. Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Birol, I., 2009. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 19, 1117–1123. <https://doi.org/10.1101/gr.089532.108>
236. Singhi, P., Malhi, P., Suthar, R., Deo, B., Khandelwal, N.K., 2018. Long-term Cognitive Outcome of Children With Parenchymal Neurocysticercosis: A Prospective Observation Study. *J. Child Neurol.* 33, 468–473. <https://doi.org/10.1177/0883073818766985>
237. Slatko, B.E., Gardner, A.F., Ausubel, F.M., 2018a. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 122, e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
238. Slatko, B.E., Gardner, A.F., Ausubel, F.M., 2018b. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 122, e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
239. Slom, T.J., Cortese, M.M., Gerber, S.I., Jones, R.C., Holtz, T.H., Lopez, A.S., Zambrano, C.H., Sufit, R.L., Sakolvaree, Y., Chaicumpa, W., Herwaldt, B.L., Johnson, S., 2002. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *N. Engl. J. Med.* 346, 668–675. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012462>

240. Sohn, W.-M., Jung, B.-K., Hong, S., Ryoo, S., Lee, K.H., Khieu, V., Chai, J.-Y., 2021. Detection of *Gnathostoma spinigerum* Advanced 3rd-Stage Larvae in the Chinese Edible Frog, *Hoplobatrachus rugulosus*, from Local Markets in Phnom Penh, Cambodia. *Korean J. Parasitol.* 59, 519–522. <https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.5.519>
241. Somboonpatarakun, C., Intapan, P.M., Sadaow, L., Rodpai, R., Sanpool, O., Maleewong, W., 2020. Development of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human angiostrongyliasis. *Parasitology* 147, 194–198. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001495>
242. Somboonpatarakun, C., Intapan, P.M., Sanpool, O., Wongkham, C., Maleewong, W., 2019. Application of Recombinant *Angiostrongylus cantonensis* Galectin-2 Protein for Serodiagnosis of Human Angiostrongyliasis by Immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 101, 851–858. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0208>
243. Spallone, A., Woroch, L., Sweeney, K., Seidman, R., Marcos, L.A., 2020. The Burden of Neurocysticercosis at a Single New York Hospital. *J. Pathog.* 2020, 8174240. <https://doi.org/10.1155/2020/8174240>
244. Stewart, B.T., Jacob, J., Finn, T., Lado, M., Napoleon, R., Brooker, S., Sidhu, P.S., Kolaczinski, J., 2013. Cystic echinococcosis in Mundari tribe-members of South Sudan. *Pathog. Glob. Health* 107, 293–298. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000111>
245. Stockdale-Walden, H.D., Slapcinsky, J., Qvarnstrom, Y., McIntosh, A., Bishop, H.S., Rosseland, B., 2015. *Angiostrongylus cantonensis* in Introduced Gastropods in Southern Florida. *J. Parasitol.* 101, 156–159. <https://doi.org/10.1645/14-553.1>
246. Swat, S., Laskowski, A., Badura, J., Frohberg, W., Wojciechowski, P., Swiercz, A., Kasprzak, M., Blazewicz, J., 2021. Genome-scale de novo assembly using ALGA. *Bioinformatics* 37, 1644–1651. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab005>
247. Ta, T.-H., Moya, L., Nguema, J., Aparicio, P., Miguel-Oteo, M., Cenzual, G., Canorea, I., Lanza, M., Benito, A., Crainey, J.L., Rubio, J.M., 2018. Geographical distribution and species identification of human filariasis and onchocerciasis in Bioko Island, Equatorial Guinea. *Acta Trop.* 180, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.030>
248. Tadesse Boltena, M., El-Khatib, Z., Kebede, A.S., Asamoah, B.O., Yaw, A.S.C., Kamara, K., Constant Assogba, P., Tadesse Boltena, A., Adane, H.T., Hailemeskel, E., Biru, M., 2022. Malaria and Helminthic Co-Infection during Pregnancy in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 19, 5444. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095444>
249. Tamarozzi, F., Silva, R., Fittipaldo, V.A., Buonfrate, D., Gottstein, B., Siles-Lucas, M., 2021. Serology for the diagnosis of human hepatic cystic echinococcosis and its relation with cyst staging: A systematic review of the literature with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009370. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009370>
250. Tanigawa, C., Fujii, Y., Miura, M., Nzou, S.M., Mwangi, A.W., Nagi, S., Hamano, S., Njenga, S.M., Mbanefo, E.C., Hirayama, K., Mwau, M., Kaneko, S., 2015. Species-Specific Serological Detection for Schistosomiasis by Serine Protease Inhibitor (SERPIN) in Multiplex Assay. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0004021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004021>
251. Tapchaisri, P., Nopparatana, C., Chaicumpa, W., Setasuban, P., 1991. Specific antigen of *Gnathostoma spinigerum* for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. *Int. J. Parasitol.* 21, 315–319. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90033-4)
252. Tappe, D., Grüner, B., Kern, P., Frosch, M., 2009. Banding pattern indicative of echinococcosis in a commercial cysticercosis Western blot. *Eur. J. Med. Res.* 14, 451–452. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-14-10-451>
253. Ta-Tang, T.-H., Berzosa, P., Rubio, J.M., Romay-Barja, M., Ncogo, P., Agudo, D., Herrador, Z., Cerrada-Gálvez, L., Benito, A., 2022. Evaluation of LAMP for the diagnosis of *Loa loa* infection in dried blood spots compared to PCR-based assays and microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 116, e210210. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210210>
254. Teem, J.L., Qvarnstrom, Y., Bishop, H.S., da Silva, A.J., Carter, J., White-McLean, J., Smith, T., 2013. The occurrence of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, in nonindigenous snails in the Gulf of Mexico region of the United States. *Hawaii J. Med. Public Health J. Asia Pac. Med. Public Health* 72, 11–14.
255. Teerasukjinda, O., Wongjittaporn, S., Tongma, C., Chung, H., 2016. Asymptomatic Giant Intraventricular Cysticercosis: A Case Report. *Hawaii J. Med. Public Health* 75, 187–189.
256. Thiangrongjit, T., Nogrado, K., Ketboonlue, T., Malaitong, P., Adisakwattana, P., Reamtong, O., 2021. Proteomics of Gnathostomiasis: A Way Forward for Diagnosis and Treatment Development. *Pathogens* 10, 1080. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091080>
257. Thiengo, S.C., de Oliveira Simões, R., Fernandez, M.A., Júnior, A.M., 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. *Hawaii J. Med. Public Health* 72, 18–22.
258. Thiengo, S.C., Maldonado, A., Mota, E.M., Torres, E.J.L., Caldeira, R., Carvalho, O.S., Oliveira, A.P.M., Simões, R.O., Fernandez, M.A., Lanfredi, R.M., 2010. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop.* 115, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.005>

259. Torgerson, P.R., Deplazes, P., 2009. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol.* 25, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.12.008>
260. Toure, F.S., Egwang, T.G., Wahl, G., Millet, P., Bain, O., Georges, A.J., 1997. Species-specific sequence in the repeat 3 region of the gene encoding a putative *Loa loa* allergen: a diagnostic tool for occult loiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 57–60. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.57>
261. Trevisan, C., Sotiraki, S., Laranjo-González, M., Dermauw, V., Wang, Z., Kärssin, A., Cvetkovikj, A., Winkler, A.S., Abraham, A., Bobić, B., Lassen, B., Cretu, C.M., Vasile, C., Arvanitis, D., Deksnė, G., Boro, I., Kucsera, I., Karamon, J., Stefanovska, J., Koudela, B., Pavlova, M.J., Varady, M., Pavlak, M., Šarkunas, M., Kaminski, M., Djurković-Djaković, O., Jokelainen, P., Jan, D.S., Schmidt, V., Dakić, Z., Gabriël, S., Dorny, P., Devleeschauwer, B., 2018. Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Eastern Europe, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3153-5>
262. Tsang, V.C., Brand, J.A., Boyer, A.E., 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159, 50–59. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.1.50>
263. UN Office for the Coordination of Humanitarian Affairs, 2023. Humanitarian response plan Mozambique.
264. UNICEF, JMP, WHO, 2023. Progress on household, drinking water, sanitation and hygiene 2000 -2022.
265. van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet. TIG* 30, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
266. van Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., Thermes, C., 2018. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet. TIG* 34, 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
267. van Heesch, S., Kloosterman, W.P., Lansu, N., Ruzius, F.-P., Levandowsky, E., Lee, C.C., Zhou, S., Goldstein, S., Schwartz, D.C., Harkins, T.T., Guryev, V., Cuppen, E., 2013. Improving mammalian genome scaffolding using large insert mate-pair next-generation sequencing. *BMC Genomics* 14, 257. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-257>
268. Vilajeliu Balagué, A., de Las Heras Prat, P., Ortiz-Barreda, G., Pinazo Delgado, M.J., Gascón Brustenga, J., Bardají Alonso, A., 2014. Imported parasitic diseases in the immigrant population in Spain. *Rev. Esp. Salud Pública* 88, 783–802. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272014000600010>
269. Vilhena, M., Santos, M., Torgal, J., 1999. Seroprevalence of human cysticercosis in Maputo, Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 59–62. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.59>
270. Viita, A., 2012. Diagnosis of human angiostrongyliasis. *Asian Biomed.* 6, 141–150.
271. Vurture, G.W., Sedlazeck, F.J., Nattestad, M., Underwood, C.J., Fang, H., Gurtowski, J., Schatz, M.C., 2017. GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. *Bioinformatics* 33, 2202–2204. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx153>
272. Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M., 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9, e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
273. Wallace, G.D., Rosen, L., 1969. Studies on eosinophilic meningitis. V. Molluscan hosts of *Angiostrongylus cantonensis* on Pacific Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 206–216.
274. Wang, P., Wang, F., 2023. A proposed metric set for evaluation of genome assembly quality. *Trends Genet. TIG* 39, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.10.005>
275. Wang, Q.-P., Lai, D.-H., Zhu, X.-Q., Chen, X.-G., Lun, Z.-R., 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis.* 8, 621–630. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70229-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70229-9)
276. Wang, Y., Ma, A., Liu, X.-L., Eamsobhana, P., Gan, X.-X., 2021. Evaluation of Rapid IgG4 Test for Diagnosis of Gnathostomiasis. *Korean J. Parasitol.* 59, 257–263. <https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.3.257>
277. Wanji, S., Tendongfor, N., Esum, M.E., Enyong, P., 2002. *Chrysops silacea* biting densities and transmission potential in an endemic area of human loiasis in south-west Cameroon. *Trop. Med. Int. Health* 7, 371–377. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00845.x>
278. Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D.A., Zhang, W., McManus, D.P., 2019a. Echinococcosis: Advances in the 21st century. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, 1–39. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
279. Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D.A., Zhang, W., McManus, D.P., 2019b. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* 32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
280. Whittaker, C., Walker, M., D.S. Pion, S.D.S., Chesnais, C., Boussinesq, M., Basáñez, M.-G., 2018. *Loa loa*: ¿More Than Meets the Eye? *Trends Parasitol.* 34, 261–263. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.002>
281. Wick, R., 2023. Porechop (<https://github.com/rrwick/Porechop>).

282. Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
283. Wilkins, P.P., Qvarnstrom, Y., Whelen, A.C., Saucier, C., da Silva, A.J., Eamsobhana, P., 2013. The current status of laboratory diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infections in humans using serologic and molecular methods. *Hawaii J. Med. Public Health J. Asia Pac. Med. Public Health* 72, 55–57.
284. Wilson, M.R., Sample, H.A., Zorn, K.C., Arevalo, S., Yu, G., Neuhaus, J., Federman, S., Stryke, D., Briggs, B., Langelier, C., Berger, A., Douglas, V., Josephson, S.A., Chow, F.C., Fulton, B.D., DeRisi, J.L., Gelfand, J.M., Naccache, S.N., Bender, J., Dien Bard, J., Murkey, J., Carlson, M., Vespa, P.M., Vijayan, T., Allyn, P.R., Campeau, S., Humphries, R.M., Klausner, J.D., Ganzon, C.D., Memar, F., Ocampo, N.A., Zimmermann, L.L., Cohen, S.H., Polage, C.R., DeBiasi, R.L., Haller, B., Dallas, R., Maron, G., Hayden, R., Messacar, K., Dominguez, S.R., Miller, S., Chiu, C.Y., 2019. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 380, 2327–2340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803396>
285. Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15, R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
286. Woolsey, I.D., Miller, A.L., 2021. *Echinococcus granulosus* sensu lato and *Echinococcus multilocularis*: A review. *Res. Vet. Sci.* 135, 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.010>
287. World Health Organization, 2020a. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030.
288. World Health Organization, 2020b. Taeniasis/Cysticercosis. [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis> (accessed 2.23.21).
289. World Health Organization, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. *Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas.*
290. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health, International Livestock Research Institute, 2015. Assembling a framework for intensified control of taeniasis and neurocysticercosis caused by *Taenia solium*: report of an informal consultation, WHO Headquarters, Geneva, 17–18 July 2014. World Health Organization, Geneva.
291. WormBase Parasite [WWW Document], 2022. URL <https://parasite.wormbase.org/species.html> (accessed 8.24.22).
292. Xie, M., Zhou, Z., Guo, S., Li, Z., Zhao, H., Deng, J., 2019. Next-generation sequencing specifies *Angiostrongylus* eosinophilic meningoencephalitis in infants: Two case reports. *Medicine (Baltimore)* 98, e16985. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016985>
293. Yera, H., Dupont, D., Houze, S., Ben M'rad, M., Pilleux, F., Sulahian, A., Gatey, C., Gay Andrieu, F., Dupouy-Camet, J., 2011. Confirmation and follow-up of neurocysticercosis by real-time PCR in cerebrospinal fluid samples of patients living in France. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4338–4340. <https://doi.org/10.1128/JCM.05839-11>
294. Yoshinaga, Y., Daum, C., He, G., O'Malley, R., 2018. Genome Sequencing. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1775, 37–52. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5_4)
295. Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
296. Zouré, H.G.M., Wanji, S., Noma, M., Amazigo, U.V., Diggle, P.J., Tekle, A.H., Remme, J.H.F., 2011. The geographic distribution of *Loa loa* in Africa: results of large-scale implementation of the Rapid Assessment Procedure for Loiasis (RAPLOA). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1210. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001210>

---

Belén González Bertolín  
belgon03@ucm.es,  
belengbertolin@gmail.com

**Título de la revisión:** Revisión de helmintosis olvidadas y emergentes.

**Título de la Tesis:** Avances en la detección serológica de helmintosis olvidadas y emergentes.

Aproximación genómica del ensamblaje de *Gnathostoma spinigerum*.

**Directoras:** María Jesús Perteguer y Ana Hernández González.

**Centro de realización:** Departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

**Centro de presentación:** Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

**Fecha de lectura:** 18 de enero de 2024.

# HISTORIA Y EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO FRENTE A *TRICHOMONAS VAGINALIS*

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

#### 1.1.1 Bibliografía de Alfred Donné

- I. 1.1. 1. Vida y obra
- I. 1.1. 2. Descubrimiento de *Trichomonas vaginalis*
- I. 1.1. 3. Donné, padre de la microscopía
- I. 1.1. 4. Papel en pediatría
- I. 1.1. 5. Importancia en la hematología
- I. 1.1. 6. El final de una gran carrera

#### 1.1.2 Historia del tratamiento

- I. 1.2. 1. Contexto histórico
- I. 1.2. 2. Azomicina, el precursor del metronidazol
- I. 1.2. 3. Descubrimiento del metronidazol
- I. 1.2. 4. En la actualidad

#### 1.1.3 Contribución del grupo de investigación

### 1.2. *TRICHOMONAS VAGINALIS*

#### 1.2.1 Morfología

- I. 2.1. 1. El hidrogenosoma

#### 1.2.2 Ciclo biológico

#### 1.2.3 Epidemiología

#### 1.2.4 Patogenia

- I. 2.4. 1. Endosimbiontes
- I. 2.4. 2. Importancia del lipofosfoglicano (LPG)
- I. 2.4. 3. Papel de las adhesinas
- I. 2.4. 4. Otras proteínas implicadas en la adhesión
- I. 2.4. 5. Respuesta inmune frente a *T. vaginalis*
- I. 2.4. 6. Los exosomas de *T. vaginalis*

#### 1.2.5 Diagnóstico

#### 1.2.6 Síntomas clínicos

#### 1.2.7 Tratamiento

- I. 2.7. 1. Mecanismo de acción del MTZ

### 1.3. CRIBADO FARMACOLÓGICO

#### 1.3.1 Cribado *in vitro*

- I. 3.1. 1. Cribado en *T. vaginalis*
- I. 3.1. 2. Citotoxicidad inespecífica

#### 1.3.2 Cribado *in silico*

- I. 3.2. 1. Cribado en *T. vaginalis*
- I. 3.2. 2. Citotoxicidad inespecífica

#### 1.3.3 Mecanismos de acción

- I. 3.3. 1. Alteración del potencial de membrana hidrogenosomal
- I. 3.3. 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)
- I. 3.3. 3. Acoplamiento molecular

## 2. BIBLIOGRAFÍA

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

### 1.1.1. *Bibliografía de Alfred Donné*

#### 1.1.1.1. *Vida y obra*

Alfred François Donné (Figura 1) nació el 13 de septiembre de 1801 en Noyon (Oise), una pequeña ciudad situada a 65 km al norte de París, donde residían sus padres Adrien Donné, un exitoso hombre de negocios de esa ciudad, y Marie Anne Gely. Su familia se trasladó a París cuando tenía 20 años, donde, por insistencia de sus padres, estudió derecho, pese a no mostrar ningún interés por dicha profesión. Sin embargo, a los 25 años decidió cambiar de carrera y comenzó a estudiar medicina en la Universidad de la Sorbona (Diamantis et al., 2009). En 1831, a la edad de 30 años, Alfred se gradu  y presentó la tesis titulada "Investigaciones sobre las moléculas de la sangre, el pus y los moco, incluidos los humores del ojo" (Thorburn 1947). Este minucioso y laborioso trabajo microscópico preveía investigaciones originales que lo situarían entre los principales pioneros de la medicina francesa del siglo XIX. Donné



Figura 1. Alfred Donné (Thorburn 1947).

desarrolló su trabajo clínico principalmente en el Hospital de la Caridad en París, donde tuvo la fortuna de trabajar con el experimentado clínico Bouillaud, de qu n se convertiría más tarde en su jefe de clínica (Diamantis et al., 2009). A través de su matrimonio, Donné emparentó con la conocida familia de médicos des Essarts. Su cu nado era el Dr. Sezille des Essarts, una autoridad médica distinguida que había ejercido en Noyon y que más tarde fue decano de la Facultad de Medicina de París (Thorburn 1947). El Consejo de la Universidad reconoció las habilidades literarias de Donné y lo nombró su bibliotecario honorario de la Facultad de Medicina. En el siglo XVIII y principios del XIX, los médicos se encontraron con una barrera peculiarmente obstructiva, que se oponía a cualquier innovación fuera del marco aceptado del sistema establecido, y se negaban a aceptar el potencial papel del microscopio en la medicina. Para Donné resultó desconcertante ya que los entomólogos y protozo logos lo habían adoptado con avidez y entusiasmo casi doscientos años antes tras el descubrimiento de las bacterias por Leeuwenhoek (Thorburn 1947).

A pesar de las reticencias del momento, la tesis de Donné impresionó a los profesores y clínicos de la Facultad de Medicina de París, quienes se dieron cuenta de la importancia del microscopio en la enseñanza médica, si se quería avanzar verdaderamente en la ciencia. Para demostrar el potencial de este instrumento en la práctica clínica, Donné invent  un microscopio plegable que cabía en el bolsillo de un abrigo (Thorburn 1947; Diamantis et al., 2009).

Durante el período de 1829 a 1835, Donné demostró ser un escritor fecundo, y además de publicar varias reseñas de libros, publicó varios informes acerca de diversos temas en medicina. Aunque estos informes no fueron de gran relevancia, abordaban asuntos como antídotos para alcaloides, estudios sobre diversas secreciones y fluidos humanos, así como una investigación sobre la fisiología de la respiración humana. También estudió las propiedades de la gelatina como sustancia alimenticia (Diamantis 2009).

#### 1.1.1.2. Descubrimiento de *Trichomonas vaginalis*

En 1836, Alfred Donné realizó una de sus mayores contribuciones a la medicina al descubrir el protozoo *Trichomonas vaginalis*. Inicialmente creyó que era el agente causante de la gonorrea, pero posteriormente lo indentificó correctamente como un protozoo común de localización genitourinaria. Este hallazgo lo publicó en una monografía dirigida a la Academia de Ciencias, titulada "Animalculi observed in purulent fluids and secretions of genital organs de hommes et femmes" (Donné 1836) (Figura 2). Al año siguiente del descubrimiento, afirmarí lo siguiente:

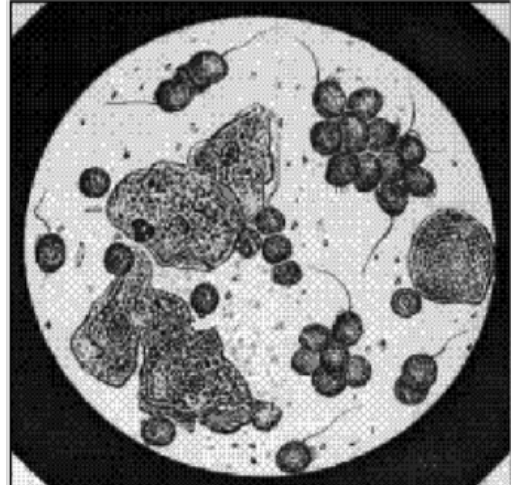


Figura 2 Diagrama de *T. vaginalis* (Diamantis et al., 2009).

“*No hay la menor duda sobre la existencia de estos microbios y su composición. Los mostré a numerosos médicos y naturalistas y todos están de acuerdo conmigo en su existencia...estos microbios forman una nueva especie de 'infusorios' [protozoos ciliados] que merece el nombre de 'vaginalis' ya que fueron descubiertos dentro de la vagina femenina.*”

(Diamantis et al., 2009)

Aunque no pudo demostrar la importancia patológica del organismo, Donné logró describir su aspecto y tamaño, además de darse cuenta de que alteraba el pH del medio en el que habita. Siguiendo el consejo del profesor Félix Dujardin (1802 - 1860), un destacado zoólogo de la Universidad de Rennes, Donné decidió nombrar a este protozoo "Tricomonas" debido a las similitudes con los géneros de protozoos Tricodes y Monas. Más adelante, el profesor de Protozoología en Berlín, Ehrenberg, fue quien otorgó al protozoo el nombre específico con el que se conoce en la actualidad. Christian Ehrenberg (1795-1876), reconoció completamente el descubrimiento de Donné, y destacó que el hábitat humano del protozoo era la vagina, de ahí su inclusión en la nomenclatura (Thorburn 1947; Diamantis et al., 2009). En 1916, Ottomar Hoehne (1871-1932) fue el primero en destacar el papel patológico de *T. vaginalis* como agente etiológico de la vaginitis purulenta (Diamantis et al., 2009).

Al año siguiente (1837), Donné continuó investigando sobre las descargas urogenitales purulentas en hombres y mujeres, publicando una breve monografía sobre varios hallazgos microscópicos titulada "*Recherches microscopiques sur la nature de mucus, et la matière des divers écoulements des organes génito-urinaires chez l'homme et chez la femme*" (Donné 1837).

Además de sus trabajos sobre el protozoo, también estudió y examinó chancros sífilíticos y bubones notando la presencia de "animáculos" y sugiriendo nuevos tratamientos para la sífilis. En dichos estudios localizó un *Vibrio* al que denominó *Vibrio lineola* (Figura 3), pero prudentemente, no lo declaró el agente causal de la sífilis. Desafortunadamente para Donné, los métodos de tinción no se descubrieron hasta 1869, cuando Hoffmann y posteriormente Weigert lograron la tinción con carmín y fucsina. En la misma monografía, Donné señaló que era posible diferenciar entre secreciones normales y patológicas utilizando el microscopio, aunque no pudo diferenciar entre los agentes causales de la sífilis y la gonorrea (Thorburn 1947; Diamantis et al., 2009).

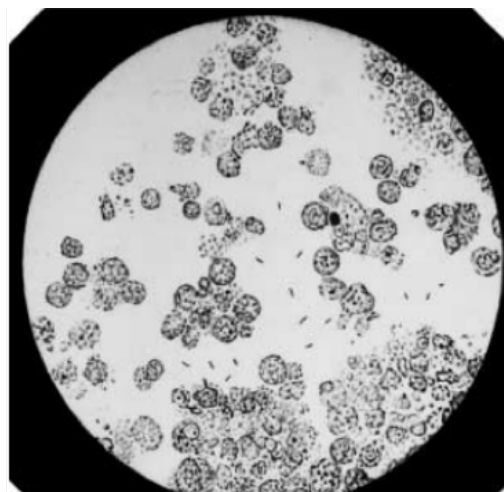


Figura 3. Chancros sífilíticos (Diamantis et al., 2009).

A pesar de sus estudios, Donné no logró obtener ni presentar conclusiones definitivas sobre la causa de las descargas sífilíticas. Bulloch afirmó en 1938 "*por las micrografías y descripciones de Donné, es evidente que su Vibrio era realmente S. refringens*" (Bulloch 1938). Finalmente, en 1905, Fritz Richard Schaudinn (1871-1906) descubrió *Treponema pallidum*, el agente causal de la sífilis.

### 1.1.1.3. Donné, padre de la microscopía

Donné colaboró con uno de sus jóvenes estudiantes, León Foucault (1819-68), famoso físico experimental que en 1851 demostró la rotación de la Tierra mediante un péndulo en el Panteón de París. Antes de convertirse en físico experimental, Foucault se matriculó en la Escuela Médica de París en 1839 con el objetivo de convertirse en cirujano gracias a la notable destreza de sus manos.

Cuando Donné comenzó a impartir sus cursos de microscopía, iniciaba siempre con una conferencia y posteriormente invitaba a sus alumnos a observar los diversos fluidos corporales de individuos sanos y enfermos a través del microscopio. Sin embargo, este método resultó poco práctico a medida que el tamaño de las clases crecía (Tobin 2006). Una solución práctica sería el uso de un microscopio de proyección para permitir que Donné mostrara cada muestra a toda la clase simultáneamente. El uso del "microscopio solar" de Lieberkühn no era posible debido a la frecuente nubosidad en París. El uso del microscopio de gas no mostraba correctamente las muestras de bajo contraste como los fluidos corporales. Foucault y Donné colaboraron para inventar el llamado microscopio de proyección "fotoeléctrico", en el que utilizaron una luz eléctrica como una fuente más brillante de iluminación (Tobin 2006). La invención de la luz eléctrica no era nueva, ya que, en 1809, Sir Humphry Davy (1778-1829) ya había demostrado la producción de grandes cantidades de luz brillante golpeando un arco eléctrico entre dos electrodos de carbono. En 1843, bajo la dirección de Donné, Foucault adaptó el arco eléctrico al microscopio de proyección.

En abril del mismo año, presentaron su instrumento, el microscopio fotoeléctrico (Figura 4), a la Academia de Ciencias de París (Diamantis et al., 2009). Un año después publicaron una descripción completa, señalando que su invención tenía como objetivo "no construir un instrumento de investigación, sino poner los resultados científicos ante los ojos del público" (Tobin 2006; Diamantis et al., 2009).

“ En abril del mismo año, presentaron su instrumento, el microscopio fotoeléctrico, a la Academia de Ciencias de París. ”

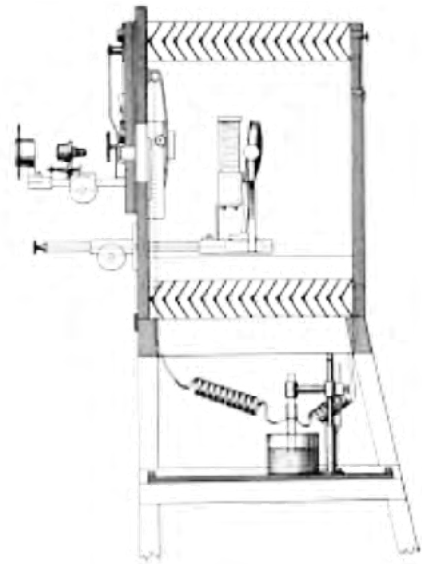


Figura 4. Vista en sección del microscopio proyector 'fotoeléctrico', diseñado por Foucault y Donné entre 1843 y 1845 para su utilización en demostraciones durante conferencias (Modificado de Tobin 2006).

Mientras tanto, Donné había llegado a comprender el valor incalculable de los microscopios para ilustrar y comprender adecuadamente sus conferencias. Los profesores clínicos de París, tanto médicos como cirujanos, reconocieron la lucha de Donné por el reconocimiento del microscopio y exigieron que sus importantes descubrimientos fueran valorados y aplicados en la medicina y la cirugía. A pesar de la falta de acción por parte de la Facultad, se reunieron el 10 de noviembre de 1837 y presentaron un enérgico informe al Consejo General de Hospitales de París. En julio de 1839, Louis Daguerre (1787-1851), uno de los inventores de la fotografía, asombró a la comunidad de París con sus impresionantes fotografías en vivo y presentó su descubrimiento a la Academia de Ciencias de París. Donné, impresionado por las fotografías de gran realismo, decidió incorporar estos impresionantes complementos a sus conferencias (Thorburn 1947).

En 1844, Donné publicó el libro "Cours de Microscopia" en el que detalló su procedimiento y mostró el alcance del instrumento. Aunque las fotografías originales eran de alta calidad, decidió que era mejor publicarlas como grabados dibujados por un artista para preservar la precisión y calidad de las imágenes. El resultado fue un Atlas que incluyó 80 grabados ampliados hasta 400 veces, que describen la morfología celular de diversos fluidos corporales como pus, sangre, orina, moco nasal y leche, así como restos celulares de bronquios, células gastrointestinales, próstata, vagina y varios tipos de epitelios, espermatozoides, óvulos y otros materiales como almidón y cristales (Donné 1844). En su libro "Cours de Microscopia" expuso lo siguiente:

(1) "A menudo oí comentarios espontáneos de elogio del público a la vista de estas imágenes llenas de vida. Me sorprende, pues, que no se aproveche este método de demostración durante las conferencias; un método tan adecuado para apoyar el celo y el talento de la atención de la audiencia, para desarrollar la propensión a los estudios y a difundir nuevas ideas. En cuanto a mí, ningún sacrificio me hizo dudar en utilizar este poderoso instrumento".

(2) "Mis conferencias, a las que asistió un gran número de estudiantes franceses y extranjeros contribuyeron a hacer comprender la importancia del microscopio y a ganar el interés y la confianza que merece. Sé lo que queda por hacer de este instrumento en la práctica médica; popularizarlo es esencial. En de los avances de esta ciencia, es imposible no tener confianza en su futuro".

Por todas estas aportaciones en el uso de las imágenes como recurso en sus exposiciones, Donné puede ser considerado como uno de los padres de las presentaciones visuales en la didáctica.

#### 1.1.1.4. Papel en pediatría

Mientras trabajaba en el hospital, Donné se dedicó a investigar los problemas de salud infantil. Donné destacó como pionero en el campo del cuidado y nutrición infantil al publicar en 1842 un manual para médicos y madres sobre la ciencia del cuidado infantil (Donné 1842), cuyo éxito lo constata las tres ediciones y cuatro reimpressiones que tuvo. En la obra el autor recomendó la lactancia materna por parte de la madre natural como garantía de una leche segura y nutritiva, lo que le granjeó una gran popularidad en Francia (la Berge 1991). Además, Donné investigó diversas condiciones patológicas asociadas con la maternidad, como la congestión mamaria, así como trastornos comunes en los niños, como la diarrea y el estreñimiento. A través del examen microscópico, fue capaz de identificar glóbulos de pus que se podían distinguir fácilmente de los glóbulos de leche mediante análisis químico. Donné también fue el primer autor en proponer el pesaje frecuente de los bebés como enfoque cuantitativo para estimar su nutrición, y recomendó que las tomas de las comidas infantiles, tanto de leche como de alimentos, fuera en intervalos iguales de tiempo. Su trabajo promovió la importancia del cuidado infantil científico y la estrecha relación entre el médico y la madre (la Berge 1991). Su éxito en el tratamiento de los problemas alimentarios de los niños prematuros llegó a oídos del público y de la Corte. El hijo menor del duque de Orleans, nieto del rey Luis Felipe, estaba enfermo debido a su incapacidad para tomar leche humana o de vaca. Donné fue llamado para ayudar, y después de varias horas de experimentación, logró encontrar una dieta de leche que resultó ser muy efectiva. Estos éxitos clínicos, tanto en su práctica general como en el hospital, y su éxito en la Corte, lo llevaron a ser nombrado Caballero de la Legión de Honor y poco después Inspector General de Medicina (Thorburn 1947). En definitiva, su trabajo promovió la importancia de establecer una relación estrecha entre el médico y la madre.

También tuvo contribuciones en el campo de la bromatología, al crear un lactoscopio (Figura 5) para medir la densidad de la leche. Descubrió que los glóbulos de la leche eran moléculas de grasa agrupadas. Como investigador polifacético, Donné también desarrolló un aparato de condensación para refrigerar y conservar la leche (Thorburn 1947).



Figura 5. Lactoscopio creado por Donné en la exposición de 2017: *Historia, conocimiento y patrimonio. 475 aniversario del Privilegio Fundacional de la Universidad de Zaragoza.*

#### 1.1.1.5. Importancia en la hematología

También realizó importantes contribuciones en el campo de la hematología, aunque son poco conocidas, no habiendo recibido la publicidad y la fama que merecen. Este es el caso de su trabajo de microscopía en 1839 con la leucemia. Durante su estancia en el Hospital Hotel Dieu, Barth y Chomell solicitaron los servicios de Donné después del fallecimiento de una paciente de 44 años con un tumor abdominal indoloro en el lado izquierdo del abdomen. Después de conocer su historial y examinarla clínicamente, solicitó una muestra de sangre. Donné examinó la sangre de la paciente y observó que la mitad de los corpúsculos parecían "glóbulos mucosos". Posteriormente, describió su observación brevemente en su manuscrito titulado "Cours de Microscopie" publicado en 1844 (Diamantis 2009). La autopsia mostró que la paciente padecía de hepatoesplenomegalia y alteraciones sanguíneas lo que llevó a Vidal a concluir que se trataba de un caso de leucocitemia esplénica (CLL Digital Archive).

*"La sangre que me ha enviado mi querido colega, muestra un cambio notable y muy conspicuo, a pesar de haber sido recogida en condiciones desfavorables, es decir, de un cadáver. Más de la mitad de las células eran glóbulos mucosos. Este hecho quizás necesite alguna explicación. Usted sabe que la sangre normal contiene tres tipos de células: 1. los glóbulos rojos, las células esenciales de la sangre; 2. los glóbulos blancos o células mucosas; 3. los glóbulos pequeños. Es la segunda variedad que domina tanto, que, uno se pregunta, sin saber nada de la evolución clínica, si esta sangre no contiene pus. Como se sabe, las células de pus aún no pueden ser diferenciadas con precisión de las células mucosas".*

En un caso posterior, en una de las conferencias de su libro *"Cours de Microscopie"* (Donné 1844), trató con mucha más precisión sobre la leucemia en un caso tratado por el Dr M. Rayer, en el que se observó una elevada proporción de glóbulos blancos en sangre en un hombre con arteritis y equimosis (CLL Digital Archive).

*"Hay condiciones en las que los glóbulos blancos parecen estar en exceso en la sangre. He encontrado este hecho tantas veces, es tan evidente en ciertos pacientes, que no puedo concebir la más mínima duda a este respecto. Uno puede encontrar en algunos pacientes un número tan grande de estas células, que incluso el observador menos experimentado queda muy impresionado. Tuve de verlas en un paciente con el Dr. Rayer en el Hospital de la Charité. Este hombre estaba afectado de arteritis, especialmente en los vasos de las piernas. Ambas piernas mostraban equimosis y ampollas gangrenosas. La sangre de este paciente mostraba tal cantidad de glóbulos blancos que pensé su sangre estaba mezclada con pus, pero al final, pude observar una clara diferencia entre estas células, y los glóbulos blancos".*

En esta obra, por primera vez en la historia de la medicina, se vincula la leucemia con una patología sanguínea anormal.

Donné señaló que distinguir microscópicamente entre glóbulos blancos normales y purulentos resultaba difícil, incluso imposible. Él sostuvo que el exceso de glóbulos blancos se debía a una detención en la diferenciación de estas células. Según Donné, los glóbulos podrían estar presentes en grandes cantidades en la sangre, antes de provocar los síntomas de la enfermedad. Él notó que los glóbulos purulentos parecían introducirse en la sangre, creando una mezcla que asemejaba al pus. Donné observó la composición alterada de la sangre de manera similar a sus predecesores, y descubrió que el aumento de la población de glóbulos purulentos tenía un aspecto idéntico al de los glóbulos blancos normales. Él sugirió que el aumento de glóbulos blancos se debía a una detención en la diferenciación, la cual sigue siendo una de las principales características de la leucemia. Desafortunadamente, Donné no describió los síntomas de los pacientes leucémicos que examinó, sin embargo, en el Atlas, las ilustraciones microscópicas muestran claramente la morfología de las células leucémicas. Donné fue el primer médico que realizó un examen microscópico preciso, la descripción y la ilustración de la composición de la sangre que se observa en estos pacientes (Krampen 2012; CLL Digital Archive).

Por lo tanto, no solo fue un pionero en la descripción de la leucemia, sino también un visionario que consideró un mecanismo patogénico bastante rudimentario pero cercano a la realidad de la enfermedad. En 1845, el Dr. John Huges Bennett (1812-1875) informó de un caso de hipertrofia del bazo e hígado en el Edinburgh Royal Infirmary y destacó que sus hallazgos se basaban en su aprendizaje en microscopía, lo que fue un reconocimiento indirecto de la guía de su tutor, Alfred Donné (Diamantis 2009).

En 1842, Donné identificó un nuevo elemento celular en la sangre, que ahora conocemos como plaquetas. En 1842, anunció su descubrimiento a la Academia de Ciencias (Donné 1842) y éstas fueron incorporadas a su *"Atlas de Microscopía"*.

#### 1.1.1.6. *El final de una gran carrera*

Debido a la situación política inestable en Francia en ese momento, se produjeron numerosos recortes de nombramientos públicos y académicos. Donné perdió su puesto de inspector general. En 1853, fue recomendado y nombrado rector de la Universidad de Estrasburgo, aunque su mandato duró poco más de un año. En 1855, se convirtió en rector de la Universidad de Montpellier, una de las instituciones educativas más antiguas de Europa. Allí, fue muy solicitado como conferenciante por las sociedades científicas y fue elegido unánimemente como presidente de estas asociaciones. Con el tiempo, se convirtió en una figura muy popular y respetada entre los estudiantes y en las reuniones de los colegios de médicos (Thorburn 1947). Durante su estancia de casi dos décadas en Montpellier, Donné se interesó por las teorías y estudios de Pouchet sobre la generación espontánea, que tenía dividida a la comunidad científica y lo colocó en el centro de la polémica con Pasteur sobre esta teoría. Aunque era amigo de Pouchet, la demostración de Pasteur de sus teorías, al analizar bacteriológicamente el aire del Mont Blanc, convenció a Donné. En 1875, dejó Montpellier y regresó a París, donde continuó participando activamente en discusiones científicas y defendiendo sus puntos de vista. Escribió varios artículos en la "Revue des deux Mondes" y en su obra mucho más extensa, "Hygiène des gens du monde".

Falleció en París de un accidente vascular cerebral el 7 de marzo de 1878. Es sin duda una grave reflexión para la posteridad médica y científica, que esta gran figura siga siendo prácticamente desconocida fuera de Francia. De hecho, no hay ninguna estatua suya en toda Francia, y algunos autores como Thorburn consideran que su contribución al progreso médico y científico y sus descubrimientos deben ocupar un lugar de honor entre los gigantes contemporáneos como Ehrlich y Pasteur.

“Es sin duda una grave reflexión para la posteridad médica y científica, que esta gran figura siga siendo prácticamente desconocida fuera de Francia.”

### 1.1.2. *Historia del tratamiento*

#### 1.1.2.1. *Contexto histórico*

Desde la identificación de *Trichomonas vaginalis* por parte de Alfred Donné en 1836, no se descubrió ningún método realmente efectivo para tratar la vaginitis provocada por este protozoo, así como tampoco se avanzó en el conocimiento del ciclo de vida de este microorganismo en los 120 años posteriores. Durante la década de 1930, tanto los ginecólogos como los venereólogos se empezaron a preocupar por la creciente prevalencia de las descargas vaginales en sus pacientes. Durante una reunión de la Sociedad Médica de Transmisión Sexual de Venéreas (S.M.T.S.V.), el Sr. Alan Brews hizo algunas sugerencias sorprendentes y posteriormente, el Sr. Ambrose King afirmó que una gran proporción de mujeres jóvenes tenían *T. vaginalis* en su flujo vaginal. Explicó que la mayoría de los casos estaban relacionados con enfermedades de transmisión sexual, temiendo que la idea no fuera aceptada por la comunidad. De hecho, "nunca había visto un caso en el que la infección se hubiera transmitido a través de una piscina". Con el tiempo, se reconoció que la vaginitis conocida como "tricomonal" era una enfermedad (ahora infección) de transmisión sexual y se profundizó en el estudio de los hábitos y el hábitat de este protozoo (Forgan 1972). El Dr. Glen Liston describió sus hallazgos detalladamente en un artículo para la S.M.T.S.V., haciendo hincapié en la importancia del pH vaginal. El Dr. Liston afirmó que, en una mujer sana, el pH vaginal es de en torno a 4, un nivel en el que los tricomonádidos no puede sobrevivir.

En palabras del Dr Liston, este grado de acidez depende de la producción de ácido láctico a partir del glucógeno del epitelio vaginal por la acción del “*bacilo de Doderlein*” (actualmente conocido como *Lactobacillus acidophilus*). El parásito, al consumir el glucógeno, altera el pH vaginal. También enfatizó que el tratamiento no debía dirigirse solo a la destrucción del parásito, sino también a la restauración del glucógeno en las células epiteliales y la recuperación del “*bacilo de Doderlein*” en la vagina (la biota bacteriana natural de la vagina), para mantener el equilibrio del pH vaginal (Liston y Lees 1940; Forgan 1972). Para evaluar la efectividad de los tratamientos, se realizaban mediciones periódicas del pH del contenido vaginal y se observaba la recuperación del glucógeno en las células epiteliales, así como la naturaleza de la biota bacteriana vaginal. Se consideraba que la curación se alcanzaba cuando el pH se mantenía en torno a 4 de manera estable. Sin embargo, se pensaba que los fármacos solo eran efectivos en la superficie del epitelio vaginal, provocando recaídas debido a la incapacidad para alcanzar a los organismos de los conductos y glándulas de la vulva (Forgan 1972). También empezó a valorarse la posibilidad de que la reinfección fuera ocasionada por parte del hombre no tratado, ya que la infección por *T. vaginalis* en el tracto urinario masculino ya había sido descrita por primera vez en 1894 por Marchand (Liston y Lees 1940).

“ También se utilizaba una técnica de electrofulguración de los conductos de Skene y la posterior cauterización de las erosiones, seguido de la extirpación de los pólipos, que se consideraban causados por la infección de *T. vaginalis*. Tras esto, se secaba la vagina y se insuflaba una mezcla de argirol, caolín y ácido láctico. ”

En aquella época, se solía tratar los flujos vaginales de cualquier origen mediante la aplicación local de diversas sustancias, incluyendo remedios caseros a base de plantas medicinales y preparados de mercurio, plata y bismuto. Uno de los tratamientos más populares y aparentemente eficaces para la tricomonosis era un preparado de arsénico, que se suministraba en forma de “*plantillas vaginales*” y polvo para insuflar. Este preparado contenía un carbohidrato para reemplazar el glucógeno perdido. Los fabricantes recomendaban no aplicar más de seis comprimidos vaginales por semana, pero se publicaron informes sobre resultados satisfactorios con el uso de hasta setenta tabletas por semana (Liston y Lees 1940; Forgan 1972). Sin embargo, el hecho de que muchos casos recaían después de la menstruación o durante el embarazo motivó el uso de dosis más altas, lo cual no estaba exento de peligro,

llegándose a registrar un fallecimiento en el hospital de Londres en 1959 por sobredosis. Debido a la frecuente recurrencia después del tratamiento con arsénico, se buscaron otros métodos, como la aplicación directa de radiación ultravioleta en la vagina e incluso la psicoterapia (Forgan 1972). También se utilizaba una técnica de electrofulguración de los conductos de Skene y la posterior cauterización de las erosiones, seguido de la extirpación de los pólipos, que se consideraban causados por la infección de *T. vaginalis*. Tras esto, se secaba la vagina y se insuflaba una mezcla de argirol, caolín y ácido láctico. Este polvo se debía aplicar durante 3 o 4 semanas tras una ducha con agua con vinagre y en caso de recaída se reanudaba durante 6 semanas (Forgan 1972). También se probaron fármacos y una serie de sustancias que se utilizaron fugazmente, y finalmente cayeron en desuso, como la aureomicina, el mafarsén, la mepacrina, la tricomicina o el negatol (Horie 1956; Forgan 1972).

En vista del éxito de las sulfonamidas en la gonorrea, también se emplearon para el tratamiento de pacientes con tricomonosis administrándose en combinación con arsénico en formulaciones tópicas o por vía oral. Sin embargo, los resultados no fueron significativamente mejores que los del arsénico en solitario (Forgan 1972). Pese a que se pensaba que el tratamiento local con arsénico en casos de vaginitis por *T. vaginalis* producía una curación total de la infección, se demostró que podían existir parásitos resistentes desde el inicio del tratamiento. Además, no actuaba sobre la infección en la uretra, no surtiendo efecto en los hombres. Los pacientes con tricomonosis fueron tratados por numerosos métodos experimentales, y los clínicos se percataron que el éxito del tratamiento dependía más de la duración que del propio método (Forgan 1972). En algunos casos se diagnosticaron infecciones por *T. vaginalis* en otras localizaciones diferentes a la genitourinaria, además de las reinfecciones continuas, lo que hizo necesario la búsqueda de un tratamiento sistémico tal y como ocurrió con la gonorrea (Durel et al., 1960). La necesidad de buscar un agente tricomonocida sistémico, llevó a la aparición de fabricantes que ofrecían fármacos sin las pruebas clínicas adecuadas, que en su mayoría resultaban inocuos para el paciente e inactivos contra el protozoo. Los resultados poco satisfactorios de estos medicamentos hicieron que se creyera que un compuesto realmente eficaz sería recibido con indiferencia. En esta época, se estaba probando el efecto antiprotozoario de diferentes antifúngicos, como la tricomicina, la eurocidina, la anisomicina y la aureotricina (Horie 1956) y otras moléculas como el acetarsol, la emetina, el yoduro de potasio, la mepacrina y el acinitrazol (Durel et al., 1960). Destacaron especialmente la tricomicina (Hammer et al., 1954; Horie 1956) y el acinitrazol (Durel et al., 1960), de los que se publicaron diversos artículos donde se ponía de manifiesto su actividad frente a *T. vaginalis* en el *British Journal of Venereal Diseases*, en los simposios de Reims de 1957 y en el *Simposio Canadiense sobre Urethritis No Gonocócica y Tricomonirosis Humana* (Montreal, septiembre de 1959). Se reconoció finalmente la eficacia local de estos compuestos, pero no su actividad sistémica, ya que, en palabras de los doctores Catterall y Nicol, no confería actividad tricomonocida "al suero o la orina" al administrarse por vía oral (Catterall y Nicol 1957).

### 1.1.2.2. Azomicina, el precursor del metronidazol

El Dr Umeza y los investigadores del Instituto Nacional de Salud de Tokio examinaron las sustancias generadas por unos 600 actinomicetos presentes en el suelo. De las cepas productoras de sustancias antimicrobianas, el 71% tenía actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Sacharomyces sake* y *Aspergillus niger*. Cuando estas sustancias fueron testadas frente a protozoos, se descubrió que la azomicina (Figura 6) presentaba un efecto tricomonocida. La azomicina fue descubierta por Maeda, Osato y Umeza (Maeda et al., 1953), y la estructura, 2-nitroimidazol (2-NI), fue determinada por Nakamura y Umeza (Nakamura 1955). Esta molécula inhibía principalmente bacterias Gram-negativas y presentó una relativa poca toxicidad frente a ratones. Se examinaron los efectos antiprotozoarios de la azomicina frente a *Euglena gracilis*, *Trichomonas foetus*, *T. gallinae*, *T. vaginalis*, *Paramecium caudatum* y *Tetrahymena galeii*. La azomicina mostró actividad frente a *T. foetus* a 2 µg/mL, *T. gallinae* a 0,3 µg/mL, *T. vaginalis* a 0,5 µg/mL, inhibió el crecimiento de *P. caudatum* a 250-500 µg/mL y no presentó actividad frente a *E. gracilis*, ni a *T. galeii* (Horie 1956).

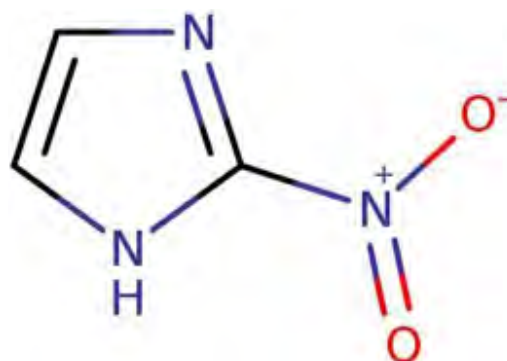


Figura 6. Estructura química de la azomicina.

### 1.1.2.3. Descubrimiento del metronidazol

Horie (1956) describió en el laboratorio las propiedades tricomonocidas de la azomicina (2-NI), descubierta años antes por Maeda (1953) y Nakamura (1955). Cosar y Julou (1959) en su búsqueda de antibióticos con actividad tricomonocida, confirmaron la actividad de esta sustancia y procedieron a estudiar otro derivado más activo y menos tóxico: el 1-hidroxi-2-metil-5-nitroimidazol (8823 R.P.). Este compuesto, presentó una baja toxicidad y una alta eficacia frente a *T. vaginalis* tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. El compuesto sintetizado en los laboratorios Specia de Paris sería conocido posteriormente con el nombre de metronidazol (MTZ) (Figura 7) (Durel et al., 1960), publicándose los primeros informes clínicos por parte de Durel, Roiron, Siboulet y Borel en los años 1959 y 1960 (Durel et al., 1960; Forgan 1972).

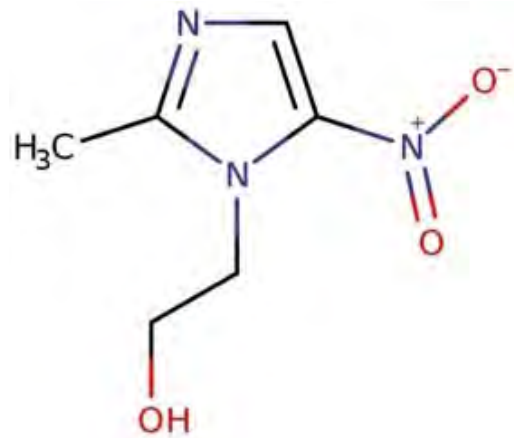


Figura 7. Estructura química del MTZ.

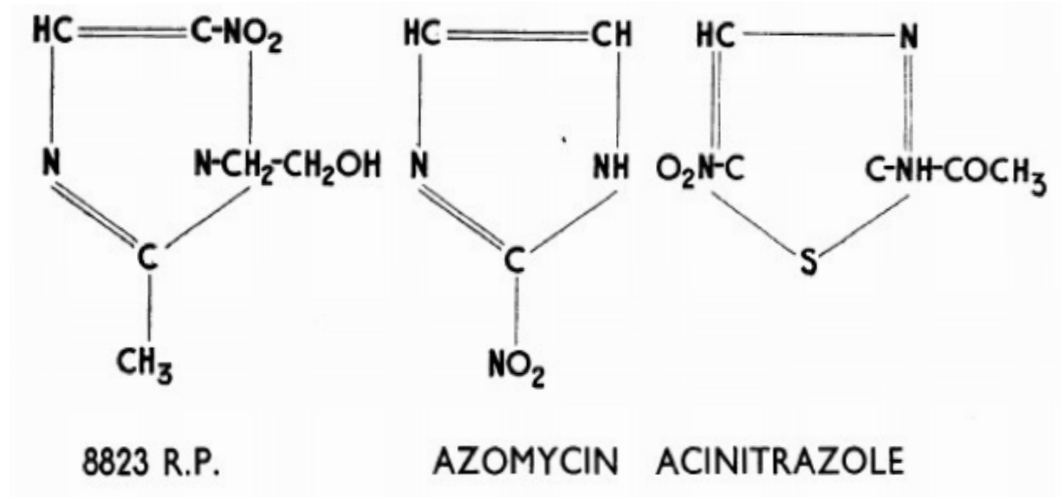


Figura 8. Comparación de las estructuras químicas del compuesto 8823 R.P. (MTZ), la azomicina y el acinitrazol (Durel et al., 1960)."

El trabajo experimental en el que se compararon el MTZ con la azomicina y el acinitrazol (Figura 8) llevó a emprender un estudio clínico entre los años 1958 y 1959 en el que se realizaron pruebas de toxicidad durante un mes administrando 50 mg/kg en ratas y 100 mg/kg en perros, además de realizar pruebas tópicas en piel y córnea de conejos. El producto fue bien tolerado y no se encontró ninguna anomalía en los tratamientos, no detectándose ninguna alteración en la movilidad de los espermatozoides en cobayas y conejos. Tras el ensayo, se concluyó que el tratamiento sistémico podría funcionar en los hombres y que en el caso de las mujeres podía considerarse un complemento al tratamiento local. Pese a este exitoso estudio, se consideró que los resultados del 1-hidroxi-2-metil-5-nitroimidazol (8823 R.P.) eran muy cuestionables (Durel et al., 1960). Sin embargo, diversos estudios posteriores confirmaron que el MTZ por vía oral, sin necesidad de un tratamiento local, resultaba efectivo para tratar la tricomonosis. Muchos de estos informes fueron presentados en la reunión de la "Medical Sexual Science and Virology Dermatology" (M.S.S.V.D.) (<https://www.mssvd.org.uk/>), convirtiéndose en un hito en la historia de la enfermedad (Nicol et al., 1960; Rodin et al., 1960).

#### 1.1.2.4. En la actualidad

El MTZ sigue siendo el fármaco de elección frente a *T. vaginalis*. Presenta buena biodisponibilidad oral, un tiempo de vida media de entre 7,3 y 8,7 horas (Houghton et al., 1979) y un potencial redox de -486 mV (Leitsch et al., 2009). Sin embargo, la constante aparición de resistencias al mismo, cercanas al 10% según algunos estudios (Schwebke y Barrientes 2006; Marques-Silva et al., 2021), la aparición de efectos secundarios como fiebre, urticaria, angioedema y shock anafiláctico (Knowles et al., 1994; Asensio-Sánchez et al., 2008) y su uso limitado en embarazo y lactancia (Cudmore et al., 2004) ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos frente a *T. vaginalis*. Se ha continuado investigando sobre otros 5-NI alternativos, como el tinidazol, el ornidazol, el secnidazol, el nimorazol, el ronidazol, o el dimetridazol (Leitsch 2017). Estos fármacos tienen un mecanismo de acción (MdA) similar: son compuestos que se administran en forma de profármacos y necesitan ser reducidos por diferentes vías para generar intermediarios radicalarios tóxicos (Miyamoto et al., 2013). Los transportadores de electrones de muchos microorganismos anaerobios presentan un potencial redox del rango del electrodo de hidrógeno, en torno a -420 mV, un valor inusualmente negativo, que provoca que tengan una fuerte capacidad reductora (Johnson 1993). Esto hace que sean capaces de reducir a diferentes grupos funcionales como los 5-NI, que presentan rangos de potenciales redox de entre -400 y -510 mV (Adams et al., 1991). Además, estos compuestos son también reducidos por enzimas presentes en estos microorganismos como la proteína tioredoxin reductasa y/o nitrorreductasas (Leitsch et al., 2009). Los radicales reducidos forman aductos con diferentes biomoléculas como el ADN, proteínas, lípidos o grupos de tiol libres, provocando la alteración funcional de los mismos. Estos aductos se establecen con unas estructuras u otras en función del microorganismo; por ejemplo, en el caso de *T. vaginalis* se ha comprobado que los radicales derivados de la activación del profármaco se unen covalentemente a proteínas que intervienen en el sistema redox mediado por la enzima tioredoxina (Leitsch et al., 2009; Miyamoto et al., 2013; Leitsch 2017).

Las propiedades farmacocinéticas de los 5-NI difieren debido a las sustituciones químicas en la cadena lateral (Miyamoto et al., 2013). El ronidazol y el dimetridazol se utilizaron ampliamente en animales de producción alimentaria, pero fueron prohibidos en los Estados Unidos y la Unión Europea debido a su posible potencial carcinógeno (Leitsch 2017). Sin embargo, el ronidazol se ha seguido utilizando para el tratamiento de microorganismos anaerobios presentes en animales compañía (Gookin et al., 2017). Respecto a la actividad tricomonocida de esta familia de fármacos en humanos destacan: tinidazol, secnidazol y ornidazol (Mtshali et al., 2022) (Tabla 1).

**Tinidazol (TNZ):** Compuesto estructuralmente similar al MTZ, y que presenta actividad frente a protozoos microaerófilos como *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica* y *T. vaginalis* (Custodio 2016). El MdA del TNZ (Figura 9) es similar al del MTZ (Vinge et al., 1983), pero presenta una vida media más larga, de entre 12 y 14 horas (Fung y Doan 2005). También posee un potencial redox similar, de -464 mV (Leitsch et al., 2009). El TNZ se usa como tratamiento alternativo al MTZ en casos refractarios frente a este. Sin embargo, el TNZ no fue aceptado en EE.UU. hasta 2004 y en numerosos países el MTZ sigue siendo el único fármaco aprobado para tratar esta infección (Nailor y Sobel 2007). Presenta una absorción oral excelente, superior al 90% (Vinge et al., 1983),

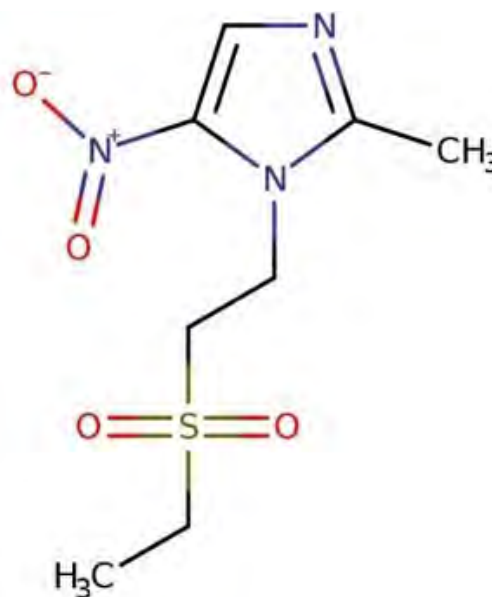


Figura 9. Estructura química del TNZ.

y la concentración mínima activa se mantiene hasta dos veces más tiempo que el MTZ (Evaldson et al., 1985), lo que aumenta su eficacia frente a los microorganismos respecto al fármaco de referencia (Mtshali et al., 2022). También posee una mejor distribución tisular que el MTZ, alcanzándose concentraciones mayores en secreciones vaginales. Sin embargo, el TNZ se detecta en leche materna incluso a las 72 horas después del tratamiento (Evaldson et al., 1985), y está clasificado como fármaco de categoría C, por lo que no se recomienda su uso en mujeres embarazadas ni en periodo de lactancia (Johnson y Gretchen 2009).

**Ornidazol:** Se trata otro derivado del 5-NI (Figura 10), y debido a esto comparte su MdA y espectro de actividad con los dos fármacos anteriores. Presenta una muy buena absorción oral, con una biodisponibilidad superior al 90% y alcanza su máximo de concentración en plasma entre las 2 y 4 horas (Schwartz et al., 1976; Horber et al., 1989). Su potencial redox (- 467 mV) es inferior al del MTZ y similar al del TNZ (Leitsch et al., 2009).

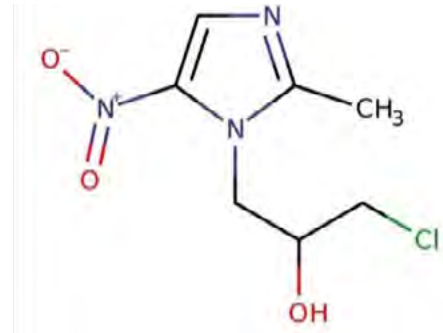


Figura 10. Estructura química del ornidazol.

La unión a proteínas es aproximadamente del 11 al 13%, ligeramente mayor a la reportada para el MTZ (Schwartz et al., 1976). La semivida es hasta 1,7 veces superior a la del MTZ, oscilando entre las 11 y 14 horas (Schwartz et al., 1976; Horber et al., 1989). El ornidazol presenta actividades similares e incluso mejores que el MTZ y el TDZ frente a organismos anaerobios o microaerófilos (Mtshali et al., 2022). Sin embargo, este agente no está aprobado para su uso en los Estados Unidos, ni en muchos otros países debido a sus efectos secundarios, leves, como estados de fatiga y mareos, o más graves, como astenozoospermia (reducción de la motilidad de los espermatozoides) (Sun et al., 2020) o encefalopatías (Tang et al., 2021).

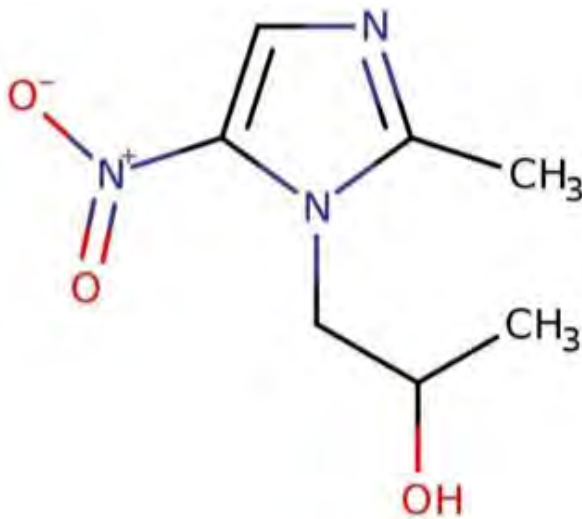


Figura 11. Estructura química del secnidazol.

**Secnidazol:** Es otro análogo estructural de los 5-NI (Figura 11). Su espectro de actividad es similar al de sus análogos, destacando su elevada actividad frente a *G. duodenalis*, resultado hasta 10 veces más activo que el MTZ (Leitch et al., 2009). Presenta el menor potencial redox (- 450 mV) (Tabla 1) (Schmid y Schmid 1999), una unión a proteínas superior al resto, (hasta del 15%), y una vida media de alrededor de 20 horas en hombres y 14 en mujeres (Gillis y Wiseman 1996). Se está estudiando su uso como posible fármaco para el tratamiento de la tricomonosis (WHO

2021b) y recientemente ha sido aprobado por la FDA para su uso en pacientes mayores de 12 años a dosis única de 2 gramos por vía oral (Muzny et al., 2023).

	Potencial redox (mV)	T <sub>1/2</sub> (Horas)
Metronidazol	-486	8 - 9
Tinidazol	-464	12 - 14
Ornidazol	-467	11 - 14
Secnidazol	-450	14 - 20

Tabla 1. Potencial redox (mV) y tiempo de vida media (T<sub>1/2</sub>) de MTZ, TNZ, Ornidazol y Secnidazol.

Además de los 5-NI empleados en el tratamiento de la tricomonosis, también se desarrollaron a partir de la azomicina compuestos 2-nitroimidazoles (2-NI) con interés en otras infecciones parasitarias. Entre ellos destaca el benznidazol (BNZ) (Figura 12), que desde su descubrimiento en 1971 es el fármaco de referencia para tratar las infecciones por *Trypanosoma cruzi* (Patterson y Wyllie 2014; Losada et al., 2021). Este compuesto actúa contra

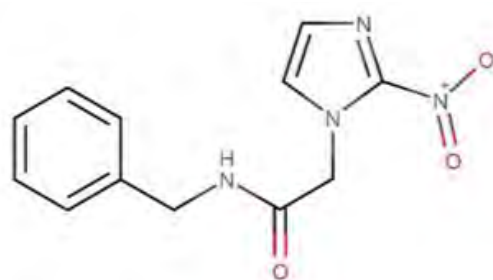


Figura 12. Estructura química del BNZ.

este protozoo de manera BNZ. análoga a como lo hacen los 5-NI frente a *T. vaginalis*; es decir, debe ser reducido por acción de diversas enzimas de *T. cruzi* generando radicales intermedios citotóxicos que interactúan con biomoléculas del protozoo (Wilkinson y Kelly 2009).

La resistencia al MTZ ha aumentado considerablemente en las últimas décadas hasta situarse cercana al 10% (Marques-Silva et al., 2021; Mtshali et al., 2022). En los casos refractarios tras repetir la misma pauta posológica varias veces con las dosis estándar, se recurre a duplicar la dosis y aumentar el intervalo de aplicación, lo que puede provocar un aumento de los efectos secundarios como vómitos y mareos (Cudmore et al., 2004). La resistencia al MTZ puede solventarse con el tratamiento de otros 5-NI, aunque en la práctica clínica el único aceptado como alternativa es el TNZ, y en muchos países no cuenta con la aprobación o no se dispone de él de manera efectiva (Cudmore et al., 2004). Además, también ha habido un aumento en aislados que muestran resistencia cruzada a otros 5-NI actualmente disponibles (Schwebke y Burgess 2004; Tejman-Yarden et al., 2011) debido a la capacidad disminuida para reducir y activar los compuestos (Leitsch et al., 2011) y/o por la detoxificación eficaz de los radicales activos que producen (Pal et al., 2009). Esto ha llevado en los últimos años a la búsqueda de nuevas familias de compuestos alternativas a estas. Además de los nitroimidazoles, se han utilizado otros fármacos para el tratamiento de la tricomonosis, como la clindamicina (McGregor et al., 1991), la furazolidona (Narcisi y Secor 1996), el mebendazol (Pattman et al., 1989) y la paromomicina (Poppe 2001). Sin embargo, estos fármacos no se consideran de primera línea debido a su menor eficacia y/o mayores efectos secundarios (Petrin et al., 1998; Schwebke y Burgess 2004). Cabe destacar también el clotrimazol, el compuesto recomendado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) durante el primer trimestre de embarazo a dosis de 100 mg por vía intravaginal durante 6 días, seguido del tratamiento estándar de MTZ en el segundo trimestre (Cudmore et al., 2004).

La historia del tratamiento de la tricomonosis ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde el uso de compuestos tóxicos y poco efectivos hasta el desarrollo de fármacos más específicos y seguros como el MTZ y el TNZ. Aunque estos fármacos han demostrado ser efectivos, es importante seguir investigando para encontrar nuevos agentes quimioterapéuticos que sean más eficaces y mejor tolerados por los pacientes. A pesar de los avances en el tratamiento farmacológico de la infección por *T. vaginalis*, aún existen desafíos para lograr una terapia más efectiva y sostenible. La resistencia a los medicamentos y la reinfección ligada al no tratamiento de la/s pareja/s, entre otras causas, son problemas comunes en la infección por *T. vaginalis* y pueden contribuir a la propagación de la infección.

### 1.1.3 Contribución del grupo de investigación a la búsqueda de nuevos agentes tricomonicidas

En la actualidad existen diferentes grupos que de forma puntual o a lo largo del tiempo han evaluado diferentes derivados de síntesis química o productos naturales (Vargas-Rigo et al., 2022) con el objetivo de buscar nuevos compuestos con actividad frente a este parásito. Entre los grupos de investigación destaca el de la Universidad Complutense de Madrid, cuyos inicios en el estudio de compuestos con potencial actividad tricomonicida datan de 1980 y cuyo papel en este campo ha sido notable. La investigación en terapia antiparasitaria constituye la línea activa más antigua de la Unidad de Parasitología del actual Departamento de Microbiología y Parasitología de la UCM. Los inicios de la línea de investigación sobre el tema, que posteriormente daría origen al grupo de investigación, fueron dos tesinas defendidas en el año 1980; una a cargo del licenciado D. Eduardo Adarve titulada "Acción antitoxoplásmica de lactotrim, sulfametoxazol y robenidina", publicada posteriormente en la revista de Anales de la Real Academia de Farmacia (1982), y otra titulada "Estudio tricomonicida experimental del nitrato de econazol", a cargo de D. José Antonio Escario García-Trevijano. La investigación en este ámbito se sustenta en dos pilares básicos; por un lado, un equipo químico, el cual se encarga de los procesos de síntesis de potenciales agentes antiparasitarios, así como de las modificaciones estructurales que mejoren su actividad. Y por otro, un equipo de biólogos responsables de la realización de los ensayos biológicos sobre los modelos, previamente estandarizados, de los patógenos diana de los compuestos proporcionados por el equipo químico.

De esta manera, iniciada la línea en los años 80 del pasado siglo, el Departamento de Parasitología estableció como objetivo prioritario el establecimiento de colaboraciones con grupos químicos interesados en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad antiparasitaria, como el de la Dra. Rosa Claramunt, del Departamento de Química Orgánica de la UNED o la Dra. Dña. Carmen Avendaño, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la UCM. Así D. José Antonio Escario, por aquel entonces Profesor Ayudante, comenzó su Tesis en 1981 dirigida por el Dr. D. Antonio Martínez, poniendo a punto los ensayos de actividad frente a diferentes modelos experimentales. Concluida en 1985, abarcó ensayos frente a *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba invadens* y *Plasmodium berghei*, y fue objeto del Premio Extraordinario de Doctorado del curso 1984-85.

Una de las prioridades de esta línea de investigación fue encontrar métodos de recuento automáticos o semiautomáticos, que proporcionasen fiabilidad, reproducibilidad, y rentabilidad, con los que dejar atrás los métodos clásicos basados en el recuento en microscopio. El primer intento en esa línea surgió con la idea de determinar la actividad tricomonicida de los compuestos a través de cuantificación de ácido láctico, metabolito que es secretado por los tricomonádidos en su metabolismo, y presente por tanto en el sobrenadante de los cultivos.

“Una de las prioridades de esta línea de investigación fue encontrar métodos de recuento automáticos o semiautomáticos, ”

La incorporación en 1986 del Prof. Miguel Belda Neto, de la Universidad Estadual Paulista de Brasil, como profesor visitante, proporcionó al grupo el conocimiento de la metodología necesaria para el manejo en el laboratorio de *Trypanosoma cruzi* y permitió su incorporación, como nuevo modelo experimental, a la batería de los ya existentes. Uno de los primeros ensayos con este parásito fue comprobar la actividad tripanocida de una serie de derivados trifenilmetánicos, sintetizados por la Dra. Carmen Avendaño, con quien el grupo ya había iniciado una fluida colaboración anteriormente con motivo de la Tesis del Dr. Escario.

La actividad y las primeras publicaciones del grupo llamaron la atención de diferentes laboratorios privados, que comenzaron a solicitar colaboraciones para la realización de los ensayos biológicos de sus moléculas. Tal fue el caso de los Laboratorios Esteve S.A. (1987) y los Laboratorios Ferrer S.A. (1988-89 y 1994-95), para la realización de pruebas de actividad de potenciales agentes tricomonicidas; y de los Laboratorios IQB (Instituto de Investigación y Desarrollo Químico- Biológico, S.A.) de Madrid para el ensayo de actividad de agentes antifúngicos en 1988-89. Esta actividad se vio recompensada con numerosas publicaciones, la mayoría en revistas del primer y segundo cuartil, así como con la presentación y defensa de varias Tesinas de Licenciatura dirigidas por miembros del grupo de investigación en Terapia Antiparasitaria, todas ellas encaminadas a la evaluación de la actividad de compuestos frente a *T. vaginalis*, *Entamoeba sp.* y *T. cruzi*.

La continuidad de este trabajo experimental requirió de financiación externa. Además de lo aportado por los laboratorios privados citados anteriormente, diferentes miembros del grupo formaron parte de distintos proyectos de investigación financiados, muchos de ellos liderados por el entonces Director del Departamento, Dr. D. Antonio Martínez Fernández. Entre ellos, cabe destacar el Proyecto de Investigación CICYT, PM-42, por su importante soporte económico durante los años 1989 a 1992; el proyecto CYTED-D: IBEROEKA-03, concedido en 1991 para el cribado y aislamiento de principios farmacológicamente activos de plantas iberoamericanas o el proyecto del Programa Acción Cost 815 sobre quimioterapia antiparasitaria, que se mantuvo durante 7 años (1991-97). Todo ello permitió afianzar la colaboración con el equipo químico del Instituto de Química Médica del CSIC, y fruto de ella fue la presentación en 1991 de la primera patente Europea, Americana y Japonesa NE 8901705, bajo el título "Nuevos compuestos de 1,4-bis (amino) benzo [g] ftalazina".

Al año siguiente (1992) comenzó la cooperación con el grupo de Química Médica de la Dra. Carmen Ochoa, cuya línea de síntesis por aquel entonces estaba enfocada fundamentalmente en derivados de 1,2,6-Tiadiazina 1,1-dióxidos, y con el que el grupo tuvo una colaboración muy fructífera. Asimismo, y con el auge que empezaron a experimentar los sistemas informáticos, el grupo de Terapia Antiparasitaria hizo un primer acercamiento a la predicción de la actividad biológica mediante el uso del cribado virtual. Este paso se realizó a través del estudio "Evaluación empírica de sistemas de inducción para el desarrollo semi-automático de bases de conocimiento", basado en el algoritmo ID3, que es utilizado actualmente dentro del ámbito de la Inteligencia Artificial. Es la antesala a lo que luego fueron los modelos in silico y se basa en sistemas binarios que asociaban una propiedad a un resultado (verdadero/falso, activo/inactivo).

“La constancia en la investigación en el campo de la terapia antiparasitaria hizo posible que el Dr. Escario y la Dra. Gómez Barrio fueran invitados a participar en la edición del libro “Avances en Parasitología” (Protozoología),”

La constancia en la investigación en el campo de la terapia antiparasitaria hizo posible que el Dr. Escario y la Dra. Gómez Barrio fueran invitados a participar en la edición del libro "Avances en Parasitología" (Protozoología), Ed. Universidade de Santiago de Compostela, 1992.; contribuyendo con dos capítulos, referentes al área de estudio del grupo: "Modelos de protozoos para el cribado farmacológico experimental" y "Trichomonas y Trichomonosis".

La concesión del mencionado proyecto del programa CYTED-D, Iberoeka 003, en 1991, y un contrato de investigación posterior “*Efectos biológicos de extractos de plantas iberoamericanas*”, financiado por el Ministerio de Industria y Energía-ASAC AIE entre el Departamento de Parasitología y ASAC, en 1995, ambos dirigidos por el Dr. D. Antonio Martínez Fernández, sentó las bases de la colaboración con varios equipos iberoamericanos. Por otra parte, la labor de continuidad de la línea de investigación sobre la enfermedad de Chagas que se había iniciado en 1986 se vio culminada con la realización y defensa de dos tesis doctorales sobre *Trypanosoma cruzi*; la primera titulada “*Cribado farmacológico contra Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Chagas, 1909*”, en 1994, y la segunda, “*Variabilidad intraespecífica en Trypanosoma cruzi y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico*”, en 1996. Ambas defendidas por D. Juan José Atienza Serna y D. Rafael A. Martínez Díaz obteniendo la máxima calificación “*apto cum laude*”.

Durante los años siguientes, el equipo mantuvo la colaboración con miembros externos a la Facultad de Farmacia a través de diversos proyectos, entre los que destaca el titulado “*Prevalencia de la tricomoniasis en Madrid. Patogenia experimental y farmacológica de los aislamientos naturales de Trichomonas vaginalis*” (Proyecto precompetitivo UCM), cuyo investigador principal fue el Dr. Escario.

“ El equipo siguió interesado, en la estandarización de una técnica de recuento automático, capaz de sustituir el recuento microscópico. ”

Al inicio del siglo XXI, se presentó la tesis doctoral “*Modelo experimental de Trichomonas vaginalis: estudios de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación*”, presentada y defendida por D. Juan José Nogal Ruiz, en el año 2000, un logro importante en el desarrollo de modelos experimentales frente a este parásito, y por la que obtuvo la máxima calificación (Sobresaliente *cum laude* por unanimidad). El equipo siguió interesado, en la estandarización de una técnica de recuento automático, capaz de sustituir el recuento microscópico. Para intentar progresar en este objetivo, la Dra. Gómez Barrio solicitó a la UCM el proyecto titulado “*Actividad ácido fosfatasa en Trichomonas vaginalis: relación con la patogenia y aplicación a la valoración farmacológica*” con referencia PR48/01-9855-2002. La tesis doctoral titulada “*Cribado farmacológico contra Trypanosoma cruzi. Estandarización y aplicación de nuevas técnicas*”, dirigida por los Dres. Gómez Barrio y Escario, y que defendió Dña. Susana Muelas Serrano, supuso un importante avance en este hito, obteniendo la calificación de Sobresaliente *cum laude* en 2001. El grupo de Terapia Antiparasitaria se fue focalizando, principalmente en la estandarización de procedimientos de cribado con dos parásitos muy diferentes en cuanto a su ubicación, metabolismo, tratamiento y, también, en cuanto a su importancia clínica: *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi*. Para ello, resultaba necesario el conocimiento profundo de la biología de los dos parásitos con el fin de orientar correctamente el desarrollo de nuevas moléculas por parte de los químicos. En base a ello, se propuso un trabajo de investigación (modalidad tesina), dirigido por el Dr. Escario, que se presentó en 2002 con el título “*Caracterización biológica de Trichomonas vaginalis*”, y que fue calificado con Sobresaliente. Sobre esta línea se consiguió financiación a través de un proyecto de investigación, con el Dr. Escario como investigador principal, que llevó por título “*Variabilidad intraespecífica de Trichomonas vaginalis: Caracterización e inducción*” cuya principal premisa era continuar profundizando en el conocimiento de la biología y el comportamiento de *T. vaginalis*.

Por otro lado, en relación con el interés del grupo por disponer de métodos de recuento automático para implementar en los procesos de cribado, se plantearon dos trabajos de investigación dirigidos por la Dra. Gómez Barrio, que permitieron la incorporación de investigadoras procedentes del Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC) de Paraguay: Dña. María Celeste Vega Gómez y Dña. Miriam Soledad Rolón. Ambos trabajos realizados con el modelo parasitario de *T. cruzi* lograron la estandarización de un método colorimétrico para el cribado farmacológico frente a este kinetoplástido, así como el estudio *in vitro* de extractos vegetales procedentes de Panamá.

En el año 2003 llegó al Departamento D. Alfredo Meneses Marcel, investigador cubano procedente del Grupo de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas de Cuba, con una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) para realizar su Doctorado en España. Como ya se ha indicado anteriormente, el cribado *in silico* era un capítulo que el equipo quería desarrollar más extensamente, a raíz de la experiencia previa con el algoritmo ID3. La experiencia de D. Alfredo Meneses en la realización de ensayos de laboratorio era escasa, pero presentaba una buena formación en Bioinformática, y concretamente en los ensayos *in silico*. Su experiencia en este campo y su contacto con el Dr. D. Yovani Marrero Ponce permitió al grupo de investigación profundizar más en este campo. El Dr. Marrero, inventor del programa TOMOCOMD-CARDD destinado principalmente a evaluar *in silico* la actividad de nuevos compuestos de síntesis, continuando la idea que el grupo tenía de introducir los modelos *in silico* en el cribado secuencial de nuevas moléculas con potencial actividad antiparasitaria. Con estas premisas, D. Alfredo Meneses realizó previamente un trabajo experimental (RD 778/1998) titulado “*Ensayos in vitro e in vivo de nuevas entidades moleculares frente a Trichomonas vaginalis*”; presentado en 2005, obteniendo la calificación de sobresaliente. Una vez adquirida la experiencia en los ensayos de laboratorio, se propuso que la Tesis Doctoral se enfocara específicamente hacia el diseño de modelos de predicción de actividad en nuevas moléculas elaboradas por el grupo de síntesis química. Bajo el título “*Identificación in silico y experimental de nuevas entidades moleculares activas frente a Trichomonas vaginalis*”, defendida en el año 2006, el Dr. Meneses obtuvo el Premio Extraordinario de Doctorado de la UCM en el curso 2006-07. Esta Tesis abrió nuevos horizontes al grupo de investigación, que incorporaría los ensayos *in silico* a su metodología secuencial del cribado.

“*Esta Tesis abrió nuevos horizontes al grupo de investigación, que incorporaría los ensayos in silico a su metodología secuencial del cribado.*”

En esos años, se inició una nueva colaboración con equipos de síntesis química. Después de haber trabajado con diferentes investigadores del Instituto de Química Médica del CSIC (el Dr. D. Federico Gómez de las Heras, la Dra. Dña. Pilar Navarro, la Dra. Dña. Pilar Goya o la Dra. Dña. Carmen Ochoa) llegó el turno del Dr. D. Vicente Arán con quien se iniciaron los primeros ensayos biológicos que culminaron

en una excelente relación científica. Resultado de la colaboración entre ambos equipos fue la concesión de sucesivos proyectos conjuntos entre el Instituto de Química Médica y el entonces Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM, así como una serie de Proyectos de Cooperación Internacional, que junto a otras colaboraciones menores han asegurado durante años la financiación del grupo, y certificaron la continuidad de la línea de investigación en los años posteriores. El primero de ellos “*Quimioterapia antiprotozoaria y anticancerosa: Búsqueda de prototipos in silico, diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos nitroheterociclos, imidazolininas y quinonas*” (M<sup>º</sup> Educación y Ciencia, SAF2006-04698), bajo la dirección del Dr. Arán, sostuvo la financiación durante los años 2006-2009.

Todos esos años de intensa actividad investigadora hizo posible el hito más importante del grupo de investigación: su reconocimiento oficial en el curso 2007-08 como Grupo de Investigación Santander-UCM, (GR58/08) con número de referencia 911120. Por aquel entonces, el grupo estaba integrado por un total de 10 miembros, pertenecientes al Departamento de Parasitología de la Universidad Complutense, la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma y el Instituto de Química Médica del CSIC. Además, mantenía las colaboraciones externas de los doctores que habían realizado su tesis doctoral en Parasitología, como las Dras. Vega Gómez y Rolón, del CEDIC (Paraguay) y los Dres. Meneses y Marrero del Centro de Bioactivos Químicos de Cuba. Esta cooperación llevo a la obtención de un Reconocimiento del VI Forum de Ciencia y Técnica, categoría "Relevante" a la Dra. Gómez Barrio y al Dr. Escario, por el trabajo "*Predicción virtual y corroboración experimental de compuestos con otros usos farmacológicos frente a Trichomonas vaginalis*" en Santa Clara (Cuba), en noviembre 2008.

Con la formalización del grupo, la actividad científica se intensificó durante los años siguiente. Además de numerosas publicaciones en revistas indexadas, muchas de ellos en el cuartil Q1, esta actividad se vio recompensada con la obtención del premio otorgado en 2009 por la Real Academia Nacional de Farmacia al trabajo titulado "*Desarrollo e integración de un sistema teórico- experimental para el descubrimiento de nuevos fármacos tricomonicidas*" firmado por varios miembros del grupo.

En 2009, y de nuevo bajo la dirección del Dr. Arán, el grupo consiguió financiación con un nuevo proyecto: "*Desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos para enfermedades parasitarias olvidadas y cáncer: síntesis, estudio biológico y optimización de nuevos compuestos, cabezas de serie*" (SAF2009-10399) del Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, la Agencia de Cooperación Internacional (AECID) concedió, bajo la dirección del Dr. Escario como coordinador general y del Dr. Meneses como coordinador en Cuba, dos nuevos proyectos: "*Selección racional, obtención y evaluación de nuevos compuestos tricomonicidas y antimaláricos (I y II)*", (A/024093/09) (A/030156/10)" durante los años 2010 y 2011. Estos tuvieron su continuidad en el año 2012, con la concesión de otro nuevo proyecto titulado: "*Acción integral para el desarrollo virtual y experimental de moléculas con actividad antiparasitaria: resistencia, diseño, modificación estructural y corroboración experimental*" (AP/036539/11). Dichos Proyectos de Cooperación Internacional permitieron el intercambio de investigadores entre la entidad cubana y española. Esta estrecha relación se formalizó con la firma del Convenio Marco entre la Universidad Central de las Villas y la Universidad Complutense de Madrid.

En el curso 2009-10 se incorporaron al grupo de investigación dos nuevas estudiantes, Dña. Cristina Fonseca Berzal, con la realización y defensa del Diploma de Estudios Avanzados titulado "*Actividad tripanocida de nuevos nitroindazoles seleccionados in silico*", por el que obtuvo la calificación de sobresaliente, y Dña. Alexandra Ibáñez Escribano con la defensa de su Trabajo de Inicio a la Investigación y posteriormente su tesina titulada "*Identificación de una nueva especie de tricomonádido (Tetratrichomonas jurumii n.sp.) en muestras fecales de oso hormiguero gigante (Myrmecophaga tridactyla)*," Tesina que supondría el germen de nuevos campos de estudio del grupo liderados por el Dr. Francisco Ponce Gordo.

“*Dichos Proyectos de Cooperación Internacional permitieron el intercambio de investigadores entre la entidad cubana y española. Esta estrecha relación se formalizó con la firma del Convenio Marco entre la Universidad Central de las Villas y la Universidad Complutense de Madrid.*”

En 2012 fue la Universidad Complutense, a través de su programa Proyectos de Cooperación al Desarrollo, quien financió un nuevo proyecto titulado “*Fortalecimiento institucional en la investigación de nuevos agentes antiparasitarios contra enfermedades parasitarias olvidadas y de alto impacto social (2012/ 2013)*”, bajo la dirección del Dr. Escario y con participación de investigadores tanto españoles como extranjeros. Al amparo de estos proyectos se cursó una carta de invitación a la investigadora cubana Dña. Yanetsy Machado Tugores, para la realización de su Tesis Doctoral bajo la dirección de los doctores Gómez Barrio, Meneses Marcel y Marrero Ponce. El trabajo de Dña. Yanetsy Machado permitió incorporar de nuevo el modelo parasitario de Plasmodium a los ya consolidados (*T. cruzi* y *T. vaginalis*). Su trabajo de tesis titulado “*Tamizaje farmacológico en la búsqueda de potenciales fármacos antimaláricos integrando nuevos modelos in silico y corroboración experimental*” fue defendida en 2013, obteniendo la calificación de sobresaliente *cum laude*.

La importancia de los trabajos del grupo de investigación en el campo de la terapia antiparasitaria permitió lograr nuevas colaboraciones con empresas. En diciembre de 2013, se firmó un contrato Artículo 83 entre el grupo de investigación y la empresa BioResponse LLC titulado “*In vitro investigation of trichomonocidal activity of 3,3'-diindolylmethane and artemisinin*” bajo la dirección de la Dra. Gómez Barrio. Los excelentes resultados de esta colaboración hicieron que en el año 2015 la empresa BioResponse LLC, volviese a contar con el grupo para la realización de un nuevo estudio “*In vitro investigation of 3,3'-diindolylmethane (DIM) against Trypanosoma cruzi*” a través de un nuevo Art. 83. Y nuevamente en 2016 solicitó un nuevo estudio titulado “*3,3'-diindolylmethane in trichomonosis: Further insights in its mode of action and synergic effect with metronidazole against T. vaginalis*” dirigido por la Dra. Ibáñez Escribano.

“*Toda esta actividad científica, permitió por una parte que vieran la luz un gran número de publicaciones de distintos miembros del grupo, así como la presentación de una nueva patente en 2015 titulada “Derivados de 5-nitroindazol y su uso como agentes antiprotozoarios”, con número de patente P201500769.*”

Toda esta actividad científica, permitió por una parte que vieran la luz un gran número de publicaciones de distintos miembros del grupo, así como la presentación de una nueva patente en 2015 titulada “*Derivados de 5-nitroindazol y su uso como agentes antiprotozoarios*”, con número de patente P201500769. En ese mismo curso 2015-16, se presentaron dos tesis doctorales en el campo de la quimioterapia antiparasitaria, la primera fruto de las investigaciones realizadas por Dña. Alexandra Ibáñez Escribano titulada “*Trichomonas vaginalis: Corroboración experimental de modelos virtuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de aislados*”, dirigida por los Dres. D. Juan José Nogal Ruiz, D. Vicente Arán y D. José Antonio Escario. Parte del trabajo de esta tesis doctoral fue Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, otorgado por la Real Academia Nacional De Farmacia por al trabajo titulado “*Trichomonas vaginalis: la versatilidad de un parásito tenaz*”. La segunda tesis fue defendida por Dña. Cristina Fonseca Berzal bajo el título “*Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas*”, bajo la dirección de los Dres. Dña. Alicia Gómez Barrio, D. Vicente Arán y D. José Antonio Escario. Ambas tesis obtuvieron la calificación de sobresaliente *cum laude*, y resultaron Premio Extraordinario de Doctorado.

En el curso siguiente (2016-17), tuvo lugar la lectura y defensa de una nueva Tesis Doctoral, esta vez a cargo de D. Sergio Sifontes Rodríguez, investigador cubano de la Universidad Central de las Villas de Santa Clara (Cuba), dirigida por el Dr. Escario y el Dr. Meneses y que con el título de “*Descubrimiento racional de compuestos químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas*” con la calificación de sobresaliente *cum laude*.

“*Como consecuencia de estas investigaciones, el grupo presentó una nueva patente titulada “Aminas derivadas de 5-nitroindazol con propiedades antiprotozoarias”, con número de registro P201700741 y fecha de solicitud en septiembre de 2018.*”

Continuando con la consecución de proyectos competitivos, en el año 2016, el grupo se aseguró la financiación por un nuevo periodo de 3 años, gracias a la concesión de un nuevo proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad titulado “*Aproximaciones basadas en la diana y fenotípicas para el descubrimiento de nuevos fármacos contra las tripanosomiasis africana y americana*”, (SAF2015-66690-R), liderado por los Dres. Vicente Arán y Christophe Dardonville.

Como consecuencia de estas investigaciones, el grupo presentó una nueva patente titulada “*Aminas derivadas de 5-nitroindazol con propiedades antiprotozoarias*”, con número de registro P201700741 y fecha de solicitud en septiembre de 2018. La presencia de investigadores en el grupo que, aunque colaboraban con la línea de investigación de Terapia Antiparasitaria, orientaban su trabajo hacia otros campos de la Parasitología, como el diagnóstico y la epidemiología, fue determinante para que el grupo cambiara su denominación por **Epidemiología, Diagnóstico y Terapia Antiparasitaria** (PARADET) con el mismo número de referencia (911120), y que bajo la dirección del Dr. Escario, estaba constituido por diez miembros: seis del Departamento de Parasitología de la UCM, y cuatro miembros externos a la UCM, uno de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y tres del Instituto de Química Médica del CSIC. Este grupo renovado queda definido en la página WEB de la Universidad Complutense en el que, además de la línea principal de quimioterapia experimental frente a diferentes modelos parasitarios y reforzada con la incorporación de nuevos miembros del IQM como el Dr. Christophe Dardonville; también se incluyen los estudios faunísticos y de taxonomía liderados por el Dr. D. Francisco Ponce Gordo o la reciente línea sobre epidemiología y caracterización biomolecular de aislados clínicos de *Trichomonas vaginalis* ([www.ucm.es/microbioparasito](http://www.ucm.es/microbioparasito)). Con el cambio de nombre del grupo, este se sometió a una nueva valoración externa en el año 2019, consiguiendo una puntuación de 84/100.

Ya con la nueva denominación, el grupo obtuvo la concesión de un nuevo proyecto del M<sup>º</sup> de Ciencia, Innovación y Universidades, dirigido por los Dres. Christophe Dardonville y Alicia Gómez Barrio bajo el título de “*Desarrollo de fármacos dirigidos a la mitocondria y orgánulos similares como enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades parasitarias desatendidas*”, para el periodo 2019-2022 (RTI2018-093940-B-100). Enlazando con este proyecto, el Dr. Escario lidera un nuevo proyecto en la XVIII Convocatoria de ayudas para proyectos de cooperación que contribuyan a la consecución de los objetivos de desarrollo sostenible de la UCM, titulado “*Fortalecimiento y desarrollo de las capacidades de investigación para el tratamiento de las enfermedades parasitarias olvidadas y desatendidas*”.

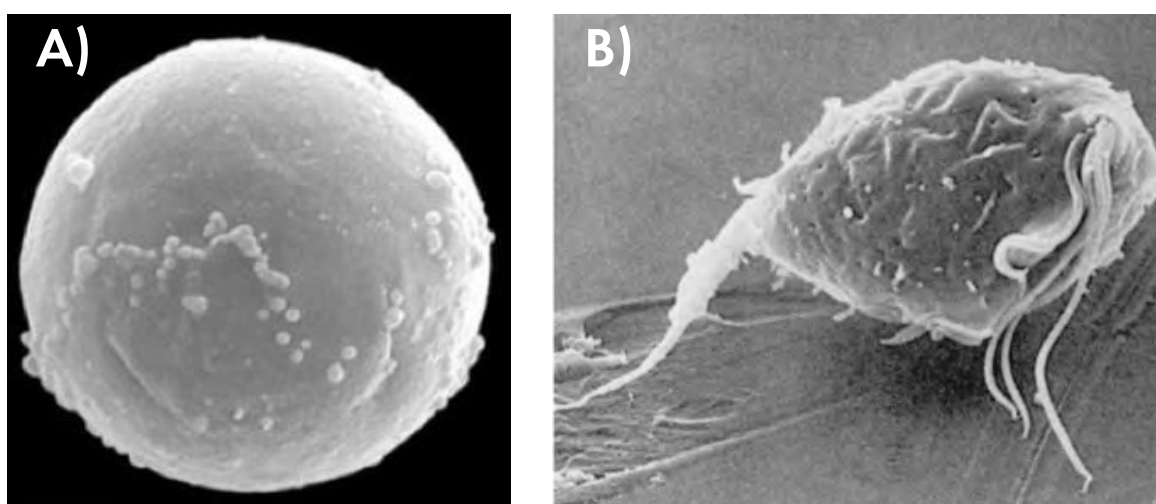
Por último y demostrando la buena salud del grupo de Epidemiología Diagnóstico y Terapia Antiparasitaria, en septiembre de este año, el Ministerio de Ciencia e Innovación ha concedido un nuevo proyecto titulado "*Development of new antiparasitic drugs targeting DNA duplexes and quadruplexes*", liderado por los Dres. Christophe Dardonville y Alicia Gómez Barrio con el que se asegura la financiación de los ensayos en quimioterapia experimental de los próximos años.

Se ha proseguido el cribado secuencial frente a *T. vaginalis* de manera activa durante los años presentes. En este periodo ha cobrado importancia la comprensión de la manera de actuar de los compuestos que se ensayan en el cribado secuencial. Así pues, el estudio de mecanismos de acción ha sido desarrollado durante la realización de las últimas tesis doctorales hasta la fecha actual. El estudio *in silico* también ha continuado su progresión mediante la aplicación de técnicas de *docking* y de modelado molecular. El grupo de **Epidemiología, Diagnóstico y Terapia Antiparasitaria (PARADET)** continua su labor en diferentes líneas experimentales destacando los avances en el proceso de cribado en diferentes modelos parasitarios.

## 1.2. TRICHOMONAS VAGINALIS

### 1.2.1. Morfología

La morfología y tamaño de *T. vaginalis* varía dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del medio en el que se encuentran, tales como pH, temperatura, nutrientes y presión osmótica. Es decir, las condiciones fisicoquímicas pueden alterar la apariencia del parásito (Petrin et al., 1998). *T. vaginalis* se encuentra en cultivo en forma de trofozoíto (carece de forma quística), con una morfología y tamaño variable, una longitud promedio de 10 nm y una anchura de 7 nm (Petrin et al., 1998). Además, cuando está adherido a células del tracto genitourinario humano, su morfología cambia y el parásito adquiere una apariencia más ameboide (Kucknoor et al., 2005). Aunque la forma en cultivo es típicamente piriforme, en forma de pera u ovalada (Figura 13), se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables o cultivos agotados, aunque esto es reversible una vez que el parásito vuelve a encontrar un medio adecuado y rico en nutrientes. Estas formas redondeadas se conocen como formas pseudoquísticas y se caracterizan por la internalización de los flagelos y de la membrana ondulante (Pereira-Neves et al., 2003).



**Figura 13.** A) Trofozoíto de *Trichomonas vaginalis*. Modificado de Petrin et al., 1998. B) Pseudoquiste de *Trichomonas vaginalis*. Tomado de Benchimol 2008.

El citoplasma contiene un único núcleo definido y se encuentra en la parte anterior del parásito. Está rodeado por una envoltura nuclear porosa. El núcleo contiene el material genético del protozoo y es responsable de controlar la división celular (Petrin 1998). El citoesqueleto de *T. vaginalis* está compuesto por fibras de tubulina y actina (Juliano et al., 1987). Se compone de microtúbulos que forman distintas estructuras, como la costa, el complejo pelta-axostilar y los filamentos parabasales, que forman su citoesqueleto (Benchimol 2004). El complejo pelta-axostilar engloba al núcleo y al aparato parabasal, el cual conecta al aparato flagelar con las vesículas de Golgi o dictiosomas (Benchimol et al., 2001). La costa, por su parte, se asocia al cinetosoma del flagelo recurrente, ofreciendo soporte mecánico a la membrana ondulante. El citoplasma presenta numerosas vacuolas y vesículas que intervienen en procesos de endocitosis, digestión-transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas unidos a gránulos de glucógeno y al retículo endoplasmático rugoso. Además del conjunto de flagelos, otra estructura importante en *T. vaginalis* es el axostilo. Se trata de un bastón delgado y alargado que comienza en el núcleo y atraviesa longitudinalmente el protozoo. El axostilo se extiende desde la parte posterior del parásito hasta su extremo afilado y se cree que ayuda a anclar al parásito a las células epiteliales vaginales. El axostilo se une en la región anterior a la pelta, que rodea el área de donde emergen los flagelos anteriores (Petrin 1998; Benchimol 2004). *T. vaginalis* se desplaza mediante un movimiento característico sin una dirección específica, debido a la presencia de cuatro flagelos en su extremo anterior y un flagelo recurrente unido a la membrana ondulante del parásito (Malli et al., 2020).

#### 1.2.1.1. El hidrogenosoma

Este protozoo pertenece a un grupo de eucariotas unicelulares, microaerófilos o anaerobios, que no presentan mitocondrias convencionales, sino un tipo de orgánulo especializado de doble membrana llamado hidrogenosoma (Shiflett y Johnson 2010). Estos orgánulos también se han identificado en hongos específicos (quitridios) y ciliados (Boxma et al., 2004, 2005). Los hidrogenosomas son pequeños y se distribuyen por el citoplasma, aunque se encuentran principalmente en las áreas paraxostilar y paracostal. Son los orgánulos encargados del metabolismo de los carbohidratos y de la producción de energía a través de la respiración celular mediante fosforilación a nivel de sustrato, transformando piruvato y malato en ATP, acetato, CO<sub>2</sub> e hidrógeno (Muller 1993; Embley y Hirt 1998). Sin embargo, no lo hacen mediante fosforilación oxidativa como las mitocondrias ya que carecen del ciclo de ácido tricarbóxico, citocromos y miembros de los complejos I-IV, con la excepción de las subunidades NADH deshidrogenasa de 51 kDa y 24 kDa (Dyall y Johnson 2000; Dyall et al., 2004; Hrdy et al., 2004). Además, también están involucrados en otros procesos celulares importantes como la regulación del calcio intracelular y la apoptosis (Muller 1993). Asimismo, es el encargado de la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante un sistema de reducción de tioredoxina de tipo bacteriano (Coombs et al., 2004). Además, se han identificado enzimas en los hidrogenosomas responsables del ensamblaje de complejos de hierro-azufre (Fe-S), que son típicos de las mitocondrias (Tachezy et al., 2001; Dolezal et al., 2007). Sin embargo, el organismo carece de peroxisomas y de la vía de reducción de glutatión normalmente presente en estas. No obstante, la presencia de proteínas de tipo mitocondrial en los hidrogenosomas, junto con similitudes en la biogénesis de ambos orgánulos, sugiere que evolucionaron a partir de un único endosimbionte  $\alpha$ -proteobacteriano (Embley y Hirt 1998; Shiflett y Johnson 2010). Las hipótesis propuestas difieren en si un solo evento de endosimbiosis dio lugar tanto a hidrogenosomas como a mitocondrias a través de una evolución divergente o si un segundo endosimbionte adicional contribuyó a la formación de los hidrogenosomas en *T. vaginalis* (Dyall et al., 2004; Embley 2006; Shiflett y Johnson 2010). La relación entre hidrogenosomas y mitocondrias ha generado un intenso debate, que plantea la cuestión de si la adquisición del endosimbionte que dio origen a las mitocondrias pudo haber estado presente en la primera célula eucariota. A medida que la lista de proteínas analizadas ha ido aumentando, ha surgido el consenso de que los hidrogenosomas, mitosomas y otros orgánulos similares a las mitocondrias evolucionaron a partir de un único endosimbionte que también dio origen a las mitocondrias (Shiflett y Johnson 2010).

### 1.2.2. Ciclo biológico

*T. vaginalis* se transmite por contacto sexual. En casos esporádicos se ha reportado la transmisión por fómites, aunque esta posible vía de transmisión no está exenta de controversia (Schwebke y Burgess 2004). Diversos estudios parecen indicar la posibilidad de infectarse por objetos con secreciones vaginales como tejidos o juguetes sexuales (Muzny et al., 2012). *T. vaginalis* solo existe como trofozoíto y carece de una forma de resistencia, lo que significa que no forma quistes para sobrevivir en ambientes hostiles y solo puede vivir en un hospedador vivo o en un ambiente adecuado para su supervivencia (Petrin et al., 1998). Este parásito solo infecta a los seres humanos y se reproduce en la mucosa genitourinaria del hombre y la mujer mediante criptopleuromitosis, un tipo de fisión binaria que se caracteriza por la formación de un huso microtubular externo al núcleo manteniéndose la membrana nuclear (Ibáñez-Escribano y Gómez-Barrio 2017). El protozoo infecta principalmente el tracto urogenital femenino y masculino, donde se adhiere a las células epiteliales y causa inflamación. Aunque en menor frecuencia, *T. vaginalis* puede encontrarse en localizaciones diferentes a la uretra y/o vagina, habiéndose aislado de glándulas de Skene y Bartholin (Moodley et al., 2002). La infección por *T. vaginalis* ocurre durante el contacto sexual con una pareja infectada (Petrin et al., 1998). La transmisión vertical de madre a neonato a través del canal del parto es posible; no obstante, la mayoría de los casos de tricomonosis neonatal son asintomáticas o se curan espontáneamente después de la disminución de los niveles de estrógenos maternos en el recién nacido, a partir de la sexta semana, o después del tratamiento con MTZ (Cudmore et al., 2004).

### 1.2.3. Epidemiología

*T. vaginalis* es la infección de transmisión sexual (ITS) no vírica con mayor incidencia a nivel mundial. Cada día se producen más de 1 millón de infecciones curables en todo el mundo, llegando a 376 millones de casos anuales. *T. vaginalis* es el agente causal de 156,3 millones de infecciones/año, representando casi el 42% de estas, seguido de *C. trachomatis* (128,5 millones), *N. gonorrhoeae* (82,4 millones) y *T. pallidum* (7,1 millones) (WHO 2021) (Figura 14).

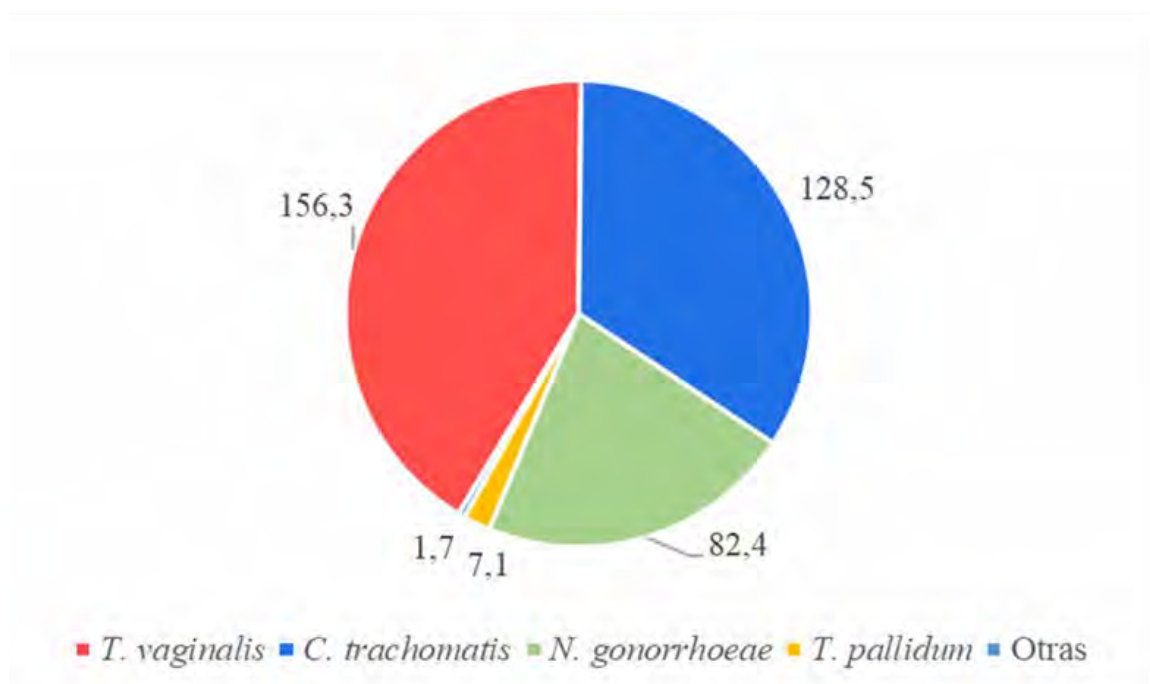


Figura 14. Prevalencia de ITS no víricas en millones de casos en 2021.

Debido al elevado número de casos asintomáticos (Miller et al., 2005; Miller y Zenilman 2005), a que no se trata de una enfermedad de declaración obligatoria (Soper 2004; Hotez 2008) y a que una gran parte de la población afectada por esta infección se encuentra en países en vías de desarrollo o en regiones con bajos recursos económicos (Sutton et al., 2007), es considerada una enfermedad olvidada ligada a la pobreza (Hotez 2008; Hotez y Gurwith 2011). Esto hace que las cifras reales sobre la prevalencia de esta infección estén infravaloradas (Van der Pol 2007; WHO 2011).

Esta ITS se asocia a diferentes factores sociales, económicos y culturales. La mayor parte de los casos se producen en mujeres, y es significativamente más prevalente en adultos y adolescentes de raza negra respecto a otros grupos étnicos. La promiscuidad sexual y la drogadicción son otros factores sociales que influyen en la prevalencia de este protozoo (Johnston y Mabey 2008; Rogers et al., 2014). También se han observado diferencias en la prevalencia de la enfermedad en función del nivel tanto económico como educativo de la población, y de la edad. Llama la atención que la tricomonosis es más común en mujeres de mayor edad y con una incidencia media superior a otras ITS (Patel et al., 2018). La tricomonosis se asocia frecuentemente con otras patologías genitourinarias, como la coinfección con *Chlamydia* (Allsworth et al., 2009; WHO 2021), con el virus del herpes simple (VHS) tanto tipo 1 como tipo 2, con *N. gonorrhoeae* (Schwebke y Hook 2003), vaginosis bacteriana (Seña et al., 2007) y con el virus del papiloma humano (VPH) (Noel et al., 2010), especialmente las infecciones con los tipos virales más oncogénicos, como las cepas 16 y 18 (Belfort et al., 2021).

Al igual que otras ITS, la tricomonosis aumenta significativamente el riesgo de infección y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Kissinger et al., 2013). Diversos estudios muestran que en los pacientes infectados con *T. vaginalis* el riesgo de infectarse por VIH-1 aumenta de 1,5 a 3 veces (Shafir et al., 2009; Bachmann et al., 2011; Masha et al., 2018). Otros estudios han demostrado que el tratamiento efectivo de la tricomonosis reduce el riesgo de contagio del VIH (Kissinger et al., 2009). En cuanto a la transmisión del VIH en personas coinfectadas con *T. vaginalis*, la evidencia directa es limitada, aunque la presencia del parásito se asocia con una mayor carga viral a nivel genital (Kissinger et al., 2009). En su artículo de revisión el equipo de Kissinger encontraron que, de catorce estudios, siete demostraban una mayor probabilidad de excreción del VIH en los fluidos genitales en personas coinfectadas con VIH y *T. vaginalis* en comparación con personas infectadas por VIH sin coinfección (Kissinger et al., 2013).

“*La tricomonosis se asocia frecuentemente con otras patologías genitourinarias, como la coinfección con Chlamydia (Allsworth et al., 2009; WHO 2021), con el virus del herpes simple (VHS) tanto tipo 1 como tipo 2, con N. gonorrhoeae (Schwebke y Hook 2003), vaginosis bacteriana (Seña et al., 2007) y con el virus del papiloma humano (VPH) (Noel et al., 2010),*”

La mayor susceptibilidad a la infección por VIH puede explicarse por diferentes razones. Primero, la respuesta inflamatoria provocada por la infección de *T. vaginalis* favorece y activa la aparición de linfocitos CD4+ en la mucosa genital. En segundo lugar, *T. vaginalis* deteriora la barrera mecánica frente a VIH al producir microhemorragias en las mucosas (Guenther et al., 2005). La integridad y salud de la mucosa cervico-vaginal es un gran mecanismo de protección frente a VIH, ya que el riesgo de transmisión en un solo contacto sexual entre un individuo infectado y una pareja sana es inferior al 1% (Thurman y Doncel 2011).

Por último, la infección por *T. vaginalis* puede alterar la microbiota vaginal fisiológica, compitiendo con las diferentes especies de *Lactobacillus*, disminuyendo la defensa natural contra organismos invasores denominada “resistencia a la colonización” (Eckburg et al., 2005) y provocando un aumento del pH vaginal por encima de 5 (Martín et al., 2010) lo que favorece la colonización de la vagina por bacterias anaerobias (Wijger et al., 2014) y facilita el desarrollo de vaginosis bacteriana, infecciones víricas (como el propio VIH) y parasitarias (Boris y Barbés 2000; Martín et al., 2010). Cabe destacar que la biota vaginal puede sufrir modificaciones en función de la edad, siendo más común en la edad prepuberal los microorganismos anaerobios mientras que en la edad reproductiva predominan los *Lactobacillus* spp. Durante esta etapa, la mujer puede desarrollar alguna de las cinco variedades de comunidades bacterianas vaginales que están descritas. Cuatro de estas comunidades están predominantemente compuestas por distintas especies de *Lactobacillus* como *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*. No obstante, existe una comunidad que se caracteriza por tener una menor presencia de bacterias productoras de ácido láctico y una mayor proporción de organismos anaeróbicos estrictos. Las comunidades vaginales con predominancia de *Lactobacillus* generan ácido láctico, contribuyendo a sostener un pH vaginal ácido y bajo. Este ambiente ácido es esencial para inhibir el desarrollo de patógenos. En contraste, las comunidades que presentan menores niveles de bacterias productoras de ácido láctico y mayores concentraciones de organismos anaeróbicos estrictos tienden a tener un pH más elevado, lo que podría incrementar la susceptibilidad a infecciones (Ravel et al., 2011). Las hormonas también afectan a la biota, dependiendo del ciclo reproductivo de la mujer, habiendo diferencias en la composición en el embarazo, el ciclo menstrual y en procesos patológicos como las ITS (Lamont et al., 2011), así como el uso de anticonceptivos y la actividad sexual (Gajer et al., 2012). En la menopausia, al disminuir los niveles de estrógenos, se produce de nuevo una modificación de la microbiota, siendo predominante *Streptococcus* spp. y *Prevotella* spp. (Brotman et al., 2014).

#### 1.2.4. Patogenia

*T. vaginalis* es un patógeno extracelular que se adhiere a las células epiteliales del hospedador para no ser eliminado por las diferentes secreciones vaginales y uretrales, siendo un mecanismo esencial para poder establecer la infección. Este protozoo también posee mecanismos para lisar y alimentarse de las células del hospedador (Ryan et al., 2011). La patogenia de *T. vaginalis* es un proceso complejo que se inicia cuando el protozoo entra en contacto con la mucosa vaginal y comienza a adherirse a las células epiteliales mediante el uso de sus flagelos y otras moléculas de adhesión presentes en su superficie que provocan cambios en la estructura y función de la célula hospedadora. Análisis de microscopía electrónica sugieren que la adhesión de *T. vaginalis* a las células del hospedador también desencadena una reorganización del citoesqueleto (Kucknoor et al., 2005). Esta interacción entre *T. vaginalis* y las células epiteliales del tracto urogenital es crucial para la patogénesis del parásito (Arroyo et al., 1992). Para establecer la infección, además de mediar el contacto con las células epiteliales del hospedador, también debe evadir la respuesta inmunitaria de este y competir con la microbiota vaginal. A esto hay que añadir que el parásito también puede convivir con endosimbiontes, como dos especies de *Mycoplasma* y virus del género *Trichomonasvirus* (TVV).

##### 1.2.4.1. Endosimbiontes

###### A) TVV

Se han descrito 5 cepas de TVV presentes en *T. vaginalis* (I, II, III, IV, V) que contribuyen a la patogénesis de este parásito (Fichorova et al., 2017; Manny et al., 2022). Se ha demostrado que los parásitos infectados por TVV presentan mayor nivel de citoadherencia respecto a los que no lo presentan, siendo significativamente más alto en el caso de TVV-2 (Fraga et al., 2012). Se cree que la presencia con TVV aumenta la expresión de genes de virulencia del parásito, como la proteína de superficie P270, altamente inmunogénica (Khoshnan y Alderete 1994) y la expresión de cisteín proteasas (CP), importantes tanto en la adhesión como en la citotoxicidad de *T. vaginalis* (Ryan et al., 2011; Fichorova et al., 2017).

Aunque algunos estudios han observado cierta correlación entre la sintomatología clínica más agresiva y la presencia de TVV en los aislados (Wendel et al., 2002; Fraga et al., 2012), otros trabajos contradicen estas observaciones (Bahadory et al., 2021). Además, se ha demostrado que TVV aumenta intensamente la respuesta proinflamatoria mediada por el receptor tipo toll (TLR-3) y el factor regulador del interferón (IRF-3) (Fichorova et al., 2012), de manera que los aislados que presentan TVV inducen de manera más eficiente la producción de mediadores proinflamatorios de la respuesta inmune (Graves et al., 2019). En este sentido, el tratamiento con MTZ de *T. vaginalis* con TVV, puede provocar que los trofozoítos liberen partículas virales que activan la vía de señalización endosomal intensificando la respuesta inflamatoria, aumentando la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos-3 (MIP-3 $\alpha$ ), la quimiocina IL-8 o la interleucina IL-16 entre otras. Todo ello contribuye a agravar la patología inflamatoria derivada de la infección por *T. vaginalis* (Fichorova et al., 2012), además de estar asociado a situaciones de parto prematuro (Fichorova et al., 2009).

## B) Micoplasmas

Desde finales del siglo XX se conoce la asociación entre *T. vaginalis* y diferentes micoplasmas, destacando entre ellos *Mycoplasma hominis* (Koch et al., 1997), el microorganismo autorreplante más simple conocido (Margarita et al., 2023). *M. hominis* habita el tracto genitourinario humano y se caracteriza por obtener energía exclusivamente de la degradación fermentativa de la arginina libre, y al igual que otros micoplasmas, depende en gran medida del metabolismo de la célula hospedadora. Este simbiote ingresa en *T. vaginalis* por endocitosis, y se reproduce en su citoplasma de manera coordinada (Vancini y Benchimol 2008). *T. vaginalis* y *M. hominis* comparten la vía de metabolismo de la arginina mediada por la arginina dihidrolasa (ADH) que utilizan para producir ATP, ornitina y amoníaco (Yarlett et al., 1996; Margarita et al., 2016). Esta vía es una fuente energética importante para los micoplasmas y fundamental para este endosimbiote (Pereyre et al., 2009). *T. vaginalis* puede usar esta ruta para obtener hasta un 10% de su energía, siendo especialmente importante en condiciones de escasez de glucosa (Margarita et al., 2016). Esto explica por qué cuando ambos microorganismos se encuentran en simbiosis, se produce un consumo mayor de la arginina libre, lo que a su vez aumenta la producción de ATP (Yarlett et al., 1996; Margarita et al., 2016) y la disminución del óxido nítrico (NO) libre por parte de los macrófagos (ya que requieren arginina para sintetizarlo), y un aumento de la ornitina intracelular de hasta 16 veces (Morada et al., 2010). Esto se traduce en un crecimiento de hasta un 20% más rápido que en *T. vaginalis* sin el endosimbiote (Margarita et al., 2016). Todos estos aspectos benefician el establecimiento y desarrollo de este protozoo y está asociado a una mayor citopatogenicidad del parásito (Margarita et al., 2016) y un aumento de las complicaciones asociadas a *T. vaginalis* durante el embarazo, como la ruptura prematura de membranas, el parto prematuro y el bajo peso al nacer (Fichorova et al., 2009). Al igual que se ha observado con TVV, ciertas moléculas de superficie de *M. hominis* activan los receptores TLR induciendo una respuesta inmunitaria mediada por citocinas proinflamatorias de manera más efectiva que el aislado en solitario, aumentando la producción de IL-8 e IL-6 por los macrófagos y desencadenando una respuesta celular al promover la activación de NF- $\kappa$ B a través de la expresión exclusiva de IL-23 por acción de aislados con *M. hominis* (Mercer et al., 2016).

Se ha identificado otro micoplasma, *Candidatus Mycoplasma girerdii* que se encuentra frecuentemente en infecciones con *T. vaginalis*, con una prevalencia del 63% (Fettweis et al., 2014).

“*T. vaginalis* y *M. hominis* comparten la vía de metabolismo de la arginina mediada por la arginina dihidrolasa (ADH) que utilizan para producir ATP, ornitina y amoníaco (Yarlett et al., 1996; Margarita et al., 2016).”

Se ha propuesto que *Candidatus* pueda ser un simbiote obligado de *T. vaginalis* (Margarita et al., 2023) ya que carece de mecanismos para realizar la glucogénesis, el ciclo de Krebs y sintetizar purinas, pirimidinas y aminoácidos. Además, a diferencia de *M. hominis*, carece de la capacidad de metabolizar arginina, ya que no presenta la enzima ADH. Sin embargo, sí que codifica factores de virulencia, como la colagenasa, la hemolisina y la endopeptidasa (Fettweis et al., 2014). Al igual que *M. hominis*, este micoplasma se asocia con un aumento del metabolismo del protozoo lo que provoca un aumento en su proliferación, además de favorecer la citoadhesión y capacidad citolítica del parásito (Margarita et al., 2023).

#### 1.2.4.2. Importancia del lipofosfoglicano (LPG)

Ciertas moléculas específicas presentes en la superficie del parásito y en las células del hospedador juegan un papel clave en la adherencia y citotoxicidad del protozoo. Entre ellas destaca el lipofosfoglicano de superficie del parásito (LPG) (Okumura et al., 2008). El LPG de *T. vaginalis* es un carbolípido puro (sin componente peptídico) que se encuentra anclado en la superficie del parásito a través del inositol-fosfoceramida. A diferencia del LPG de otros parásitos (como *Leishmania*), el LPG de *T. vaginalis* no sufre cambios estructurales durante el desarrollo de este (Singh et al., 2009). Desde su descubrimiento como el glicoconjugado más abundante en la superficie del protozoo ( $2-3 \times 10^6$  copias/parásito), el LPG de *T. vaginalis* ha sido objeto de extensos estudios debido a su papel en la adherencia del trofozoito a las células epiteliales (Singh et al., 2009; Ryan et al., 2011). Se ha observado que existe una relación dosis-respuesta entre el LPG de *T. vaginalis* y la adherencia del parásito (Fichorova et al., 2006). Además, los mutantes sin LPG han demostrado una disminución en la adherencia a las células epiteliales ectocervicales humanas (Bastida-Corcuera et al., 2005; Okumura et al., 2008). El LPG se une a la galectina-1 de la célula hospedadora (Okumura et al., 2008). Las galectinas son una familia de glicoproteínas que contienen uno o dos dominios de reconocimiento de carbohidratos con afinidad a oligosacáridos de galactosa ( $\beta$ -galactósidos) que han evolucionado de manera conservada (Rabinovich y Gruppi 2005). Se ha comprobado que las células epiteliales liberan galectina-1 y galectina-3 tras la infección por *T. vaginalis*. Estas proteínas poseen funciones inmunitarias opuestas, ya que galectina-1 suprime las respuestas de los leucocitos a los estímulos inflamatorios mientras que la galectina-3 las favorece (Rabinovich y Gruppi 2005; Nieminen et al., 2008). Estas galectinas son las responsables de la modulación de la respuesta inflamatoria en las células epiteliales vaginales (Fichorova et al., 2008). Por otro lado, se ha comprobado que el LPG desencadena una respuesta inflamatoria específica y que regula selectivamente la producción de quimiocinas como la IL-8 y la proteína inflamatoria MIP-3 $\alpha$  por las células epiteliales cervicales y vaginales humanas, de manera independiente del TLR-4 (Fichorova et al., 2006).

#### 1.2.4.3. Papel de las adhesinas

Además del LPG, el parásito presenta una serie de proteínas (adhesinas), que median también en el proceso de adhesión del parásito a las células epiteliales demostrándose que su presencia está relacionada con niveles más altos de citoadherencia del protozoo. Entre ellas destacan la AP23, AP33, AP51, AP65 y AP120 (Arroyo et al., 1992; Garcia y Alderete 2007; Ryan et al., 2011). Estas adhesinas son proteínas bifuncionales que desempeñan diversos papeles en el metabolismo del protozoo cuando no son expresadas en la superficie celular. Así pues, AP120 se corresponde con la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) (Moreno-Brito et al., 2005), AP65 con la enzima málica (O'Brien et al., 1996) y AP33 y AP51 con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente de la succinil coenzima A sintetasa (Alderete et al., 1998; Enbring y Alderete 1998). La expresión de estas adhesinas en la membrana externa se produce en respuesta al contacto del parásito con las células epiteliales vaginales, lo que coincide con un cambio en la forma del trofozoito hacia una forma ameboide.

Después de la adherencia inicial, los trofozoítos de *T. vaginalis* reclutan más parásitos, formando agregados notables de células ameboides en la superficie epitelial (Arroyo et al., 1992). Destaca la importancia de la proteína de superficie AP65, ya que se ha observado como anticuerpos IgG anti-AP65 del suero inhiben la citoadherencia de *T. vaginalis*, cosa que no ocurre con otras adhesinas (García et al., 2003). Esta proteína también es importante en novedosos métodos diagnósticos para la detección de esta infección (Li et al., 2020). Los genes que codifican estas proteínas, a excepción de AP51, son regulados al alza a nivel transcripcional por la presencia de hierro, que es considerado un mediador esencial en el crecimiento del parásito y un factor clave en su virulencia (Ryu et al., 2001). Otros estudios han demostrado la capacidad de las proteínas AP51 y AP65 de unirse al hierro de la hemoglobina, lo que sugiere que *T. vaginalis* podría utilizar estas biomoléculas como fuentes de hierro (García et al., 2003; Ryan et al., 2011).

#### 1.2.4.4. Otras proteínas implicadas en la adhesión

Durante la última década se han identificado diferentes factores implicados en la adhesión y patogenia de *T. vaginalis*. En los ensayos realizados por Muñoz et al. (2012), la inhibición de la fosfatasa TvPP1g por caliculina A y el empleo de suero anti-TvPP1g redujeron la adherencia del parásito a células HeLa en un 50% (Muñoz et al., 2012). Además, según estudios realizados por Miranda-Ozuna entre otros, la triosa fosfato isomerasa (TvTFI), una enzima glucolítica de *T. vaginalis*, se une a laminina y fibronectina, lo que sugiere que TvTFI podría desempeñar un papel en la adherencia a la matriz extracelular durante la infección (Miranda-Ozuna et al., 2016). También la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, además de su papel en el metabolismo energético, se ha demostrado que está involucrada en la citoadherencia cuando se localiza en la membrana del parásito (Lama et al., 2009).

“Según estudios realizados por Miranda-Ozuna entre otros, la triosa fosfato isomerasa (TvTFI), una enzima glucolítica de *T. vaginalis*, se une a laminina y fibronectina, lo que sugiere que TvTFI podría desempeñar un papel en la adherencia a la matriz extracelular durante la infección (Miranda-Ozuna et al., 2016).”

Hay otro grupo de proteínas que, aunque también interviene en procesos de adhesión, tienen un papel muy relevante en el efecto citotóxico sobre las células epiteliales: las cisteín proteasas (CP). Algunas como la CP65 se localizan tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. En este caso, se ha comprobado que los anticuerpos frente a esta proteína reducen significativamente la citotoxicidad del parásito frente a células HeLa, lo que indica que CP65 está implicada en el daño celular causado en la infección (Alvarez-Sanchez et al., 2000). Otra proteína de este grupo es la CP30, que además de participar en los procesos de adhesión, es capaz de producir toxicidad en células epiteliales, lo que favorece el establecimiento del parásito en la mucosa vaginal (Kummer et al., 2008).

#### 1.2.4.5. Respuesta inmune frente a *T. vaginalis*

Se ha comprobado que las cisteín proteasas como la CP30 degradan los anticuerpos IgG, IgM e IgA, y ejercen un efecto citotóxico en las células epiteliales vaginales, así como en las células inmunitarias de la mucosa (Sommer et al., 2005). Por otro lado, las cistein proteasas inducen una respuesta inflamatoria, al estimular la IL-8, los leucotrienos, las especies reactivas de nitrógeno y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Ryu et al., 2004; Fichorova 2009). La quimiocina IL-8 tiene importancia en la respuesta inmune del hospedador frente a *T. vaginalis*, liberada tras el reconocimiento de la LPG presente en la superficie del parásito (Fichorova et al., 2016) por la galectina. La interacción LPG-galectina parece tener una gran importancia en la señalización inmunológica provocada por la infección por este protozoo (Vasta 2012).

Por último, es interesante resaltar que *T. vaginalis* puede atacar las células epiteliales mediante un mecanismo denominado trogocitosis, similar al de *Entamoeba histolytica* (Middlej y Benchimol 2010). La trogocitosis es un mecanismo de ingestión celular mediante el cual una célula engulle y digiere a otra, adquiriendo los nutrientes y biomoléculas de esta. A diferencia de la fagocitosis, que implica la ingestión completa de la célula objetivo, en la trogocitosis solo se engloban partes específicas de esta. *T. vaginalis* puede utilizar ambos mecanismos de citotoxicidad frente a las células del hospedador (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2021).

#### 1.2.4.6. Los exosomas de *T. vaginalis*

También se ha estudiado el papel de los exosomas en la patogenia de *T. vaginalis*. Estas vesículas extracelulares contienen una variedad de moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Ong et al., 2022) y pueden fusionarse con las células del hospedador preparándolas para la adherencia del parásito, afectando a la expresión de diferentes proteínas. Estos exosomas al ser incorporados por las células epiteliales pueden inducir su muerte celular o la activación de vías de señalización celular. También pueden desempeñar un papel en la patogénesis de *T. vaginalis* al modular la respuesta inmunitaria del hospedador como la inducción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias como IL6 o IL8 (Twu et al., 2013). Estudios recientes también parecen indicar que estos exosomas podrían contener TVV, al encontrarse proteínas de la cápside viral en el interior de esas vesículas, lo que sugiere que podría ser otra posible vía de transmisión de estos virus entre *T. vaginalis* (Ong et al., 2022).

#### 1.2.5. Diagnóstico

El método de diagnóstico directo en la identificación de *T. vaginalis* ha sido tradicionalmente el examen microscópico en busca de trofozoítos móviles en una muestra de exudado vaginal o endocervical en el caso de mujeres (Bachmann et al., 2011; Hobbs y Seña 2013), o muestras uretrales, de orina o semen en el caso de hombres. Si bien el examen en fresco de la muestra es económico y rápido, su uso se limita por su baja sensibilidad, que varía del 44 al 68%, en comparación con el cultivo o con métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Patil et al., 2012; Hobbs y Seña 2013). Este porcentaje disminuye si la infección tiene una baja carga parasitaria (Garber 2005) o si se produce un retraso entre la toma de muestra y el examen microscópico (hasta un 20% por cada 10 minutos de demora) (Kingston et al., 2003). Además, se ha demostrado que las infecciones causadas por aislados más invasivos de *T. vaginalis* pueden escapar a la detección por métodos de diagnóstico rutinarios, debido a la invasión agresiva y más profunda de la mucosa vaginal, reduciéndose su localización de manera exclusiva en la luz vaginal. Esto indicaría que las infecciones causadas por aislados más patogénicos podrían estar infradiagnosticadas (Escario et al., 2010).

El cultivo es considerado el estándar para el diagnóstico de la tricomonosis, con una sensibilidad estimada de entre el 81 - 94% (Garber 2005; Bachmann et al., 2011). El cultivo en medio Diamond es el método tradicional utilizado para el aislamiento de *T. vaginalis* (Diamond 1957; Garber et al., 1987). Consiste en introducir las muestras (secreciones vaginales en mujeres; hisopo uretral, sedimento de orina o semen en hombres) con sospecha de infección por *T. vaginalis* en el medio de cultivo y observarlo al microscopio durante 5-7 días consecutivos, con el fin de visualizar los trofozoítos o las formas pseudoquisticas del protozoo. Sin embargo, la contaminación con bacterias vaginales es común, lo que hace que esta técnica sea difícil (Garber 2005), además de requerir de mayor tiempo que otras pruebas diagnósticas.

El genoma de *T. vaginalis* contiene secuencias de ADN repetidas y altamente conservadas que son *loci* atractivos para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs), ya que proporcionan un mayor número de copias por célula, mejorando la sensibilidad y los límites de detección (Banda et al., 2013). A pesar de que la técnica de PCR implica la necesidad de personal altamente capacitado, así como de equipos y reactivos más costosos que otros métodos alternativos, es considerado un método altamente sensible y rápido en el diagnóstico del protozoo. Para las pruebas de PCR específicas de *T. vaginalis*, se evalúan diferentes genes, entre los cuales destacan el gen de la beta-tubulina, el cual ha demostrado una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98% (Madico et al., 1998; Simpson et al., 2007) y el gen del ARNr 18S con sensibilidad y especificidad cercana al 100% (Simpson et al., 2007; Banda et al., 2013). Además, existen test rápidos aprobados por la FDA para el diagnóstico rápido de *T. vaginalis*, como la inmunocromatografía OSOM® *Trichomonas* Rapid Test (Sekisui Diagnostics), aunque su uso está aprobado únicamente para muestras vaginales (Campbell et al., 2008). La prueba Solana® (Quidel) y AmpliVue *Trichomonas* (Quidel), también aprobados por la FDA, detecta ADN y presentan muy buena especificidad y sensibilidad (Gaydos et al., 2016, 2017). Aptima *T. vaginalis* (Beckton Dickinson) se usa para detectar ADNr 18S del protozoo, aunque no es considerado un test rápido (Schwebke et al., 2011).

### 1.2.6. Síntomas clínicos

La presentación clínica de *T. vaginalis* varía en función del género y la presencia o ausencia de síntomas. Se estima que el 85% de las mujeres y el 77% de los hombres con *T. vaginalis* son asintomáticos al comienzo de la infección (Sena et al., 2007; Sutton et al., 2007; WHO 2021b). Sin embargo, aproximadamente la mitad de las mujeres asintomáticas pueden volverse sintomáticas en un plazo de 6 meses (Petrin 1998). Las infecciones no tratadas pueden durar desde meses hasta años (Peterman et al., 2009). Los síntomas en mujeres incluyen eritema vaginal, dispareunia, disuria, secreción vaginal (a menudo difusa, maloliente y de color amarillo-verde), irritación vulvar, prurito en la región genital y *colpitis macularis* o "cérvix con apariencia de fresa" que se observa tras el examen pélvico en un 5% de los casos y que aumenta al 50% al realizar una colposcopia (examen del cuello uterino). Los hombres pueden presentar uretritis, epididimitis, prostatitis y disminución de la motilidad espermática (Wølner-Hanssen et al., 1989; Moodley et al., 2002). Entre las complicaciones que pueden desarrollar las mujeres infectadas por *T. vaginalis* destacan el mayor riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria pélvica, especialmente en mujeres coinfectadas con VIH (Moodley et al., 2002). *T. vaginalis* también se asocia con una probabilidad 2,1 veces mayor de desarrollo de cáncer de cuello uterino (Yang et al., 2018). Otros estudios afirman que también existe asociación entre el protozoo y el cáncer de próstata, aunque esta relación no presenta significación estadística en todos los estudios (Najafi et al., 2019).

En cuanto a la relación entre *T. vaginalis* y el embarazo, se han publicado dos metaanálisis que proporcionan evidencia de que este protozoo se asocia con problemas durante la gestación y con una probabilidad 1,4 veces mayor de complicaciones como bajo peso al nacer, parto y ruptura prematura de membranas (Silver et al., 2014; van Gerwen et al., 2021). Un estudio ha relacionado la infección materna por este protozoo y la discapacidad intelectual en niños nacidos de madres infectadas, aunque no hay estudios adicionales publicados sobre este tema (Mann et al., 2009).

Aunque es rara, se han descrito casos de infección neonatal por *T. vaginalis*. Se cree que el contacto directo con el parásito en el tracto genitourinario materno durante el parto puede ser la causa de la infección. En los neonatos infectados se identifica el protozoo en secreciones vaginales, en orina y en aspirados traqueales. *T. vaginalis* puede provocar infecciones neonatales en las vías respiratorias y urinarias, y aumenta el riesgo de desarrollar infecciones bacterianas concomitantes (Carter et al., 2008; Schwandt et al., 2008; Trintis et al., 2009).

La infección por *T. vaginalis* modifica la microbiota vaginal, que en mujeres sanas suele estar poblada de *Lactobacillus* spp. que, mediante la producción de ácido láctico, mantienen el pH vaginal en el rango de 3,5 - 4,5, lo que protege frente a infecciones virales, bacterianas y protozoarias. Cabe destacar que la presencia del parásito puede ocurrir en el contexto de un pH vaginal normal (Petrin 1998). *T. vaginalis* modifica esta biota vaginal y compite con *Lactobacillus* spp. provocando un aumento del pH a más de 5, al disminuir la cantidad de ácido láctico producido (Boris y Barbés 2000; Martín et al., 2010).

“*T. vaginalis* modifica esta biota vaginal y compite con *Lactobacillus* spp. provocando un aumento del pH a más de 5, al disminuir la cantidad de ácido láctico producido (Boris y Barbés 2000; Martín et al., 2010).”

### 1.2.7. Tratamiento

El MTZ es un medicamento sintético perteneciente a la clase de los 5-NI, considerado como el pilar del tratamiento de infecciones anaerobias en todo el mundo, por lo que se encuentra dentro de los "medicamentos esenciales" establecidos por la FDA. Fue desarrollado en 1959 por Cosar y Julou (Cosar y Julou 1959) específicamente para tratar la tricomonosis, ITS frente a la que no existían tratamientos eficaces. La estructura básica del MTZ deriva del 2-nitroimidazol, o azomicina (Maeda et al., 1953). Este fármaco ha demostrado ser muy efectivo frente *T. vaginalis*, *G. duodenalis* (Schneider 1961) y *E. histolytica* (Powell et al., 1966), así como frente a bacterias anaerobias y microaerófilas como *Clostridium* spp. (Freeman et al., 1968), *Fusobacterium fusiforme* (Füzi y Csukás 1969), *Bacteroides fragilis* (Nastro y Finegold 1972) y *Helicobacter pylori* (Smith y Edwards 1995). Aunque existen varios fármacos de la familia de los 5-NI disponibles, el MTZ es el más utilizado (Sherrard et al., 2014) debido a su bajo coste. El TNZ es una alternativa terapéutica al MTZ, presenta mejor biodisponibilidad en tejidos (Viitanen et al., 1985), tiene una vida media aproximadamente un 70% mayor que la del MTZ (12,5 horas), alcanza niveles más altos en suero y produce menos efectos secundarios gastrointestinales (Wood et al., 1975; Viitanen et al., 1985). Sin embargo, resulta más caro y no se encuentra aprobado en muchos países (Bachmann et al., 2011). Varios estudios han demostrado que la terapia con TNZ tiene una tasa de fracaso igual o menor que la terapia con MTZ (Nailor y Sobel 2007; Sherrard et al., 2014), lo que sugiere que TNZ podría ser más eficaz que el MTZ en el tratamiento de esta infección (Gabriel et al., 1982; Forna et al., 2003; WHO 2021 b).

El tratamiento de elección frente a *T. vaginalis* ha sido históricamente una única dosis oral de 2 g de MTZ (Muzny y Schwebke 2013). Sin embargo, nuevas directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan el tratamiento de mujeres con MTZ en dosis de 500 mg dos veces al día durante una semana (WHO 2021 b). Esta modificación de la posología es debida a estudios que demostraron que la proporción de mujeres tratadas y que volvieron a dar positivo a *T. vaginalis* transcurrido un mes desde el tratamiento se redujo a la mitad con el uso de múltiples dosis respecto a la dosis única (Kissinger 2010, 2017). Esta misma posología también se ha recomendado en mujeres VIH positivo (Kissinger et al., 2013, 2022). No hay estudios sobre el efecto de una posología múltiple del MTZ en hombres, por lo que el tratamiento recomendado sigue siendo la dosis única de 2 g de MTZ, independientemente de si hay o no coinfección con VIH (Kissinger et al., 2013; WHO 2021 b, Kissinger et al., 2022). El gel intra-vaginal de MTZ tiene una eficacia limitada y, por lo tanto, no se recomienda. El TNZ en dosis única de 2 gramos es el tratamiento alternativo en casos de fallo del MTZ (Muzny y Schwebke 2013) (Tabla 2).

Paciente	Posología
Mujeres	MTZ 500 mg por vía oral, 2 veces al día, 7 días
Hombres	MTZ 2 g por vía oral en una sola dosis
Alternativa	TNZ 2 g por vía oral en una sola dosis

Tabla 2. Tratamiento de la tricomonosis recomendada por la OMS (2021).

La actividad de estos fármacos depende de la reducción de su grupo nitro, ejerciendo su actividad antiparasitaria mediante la alteración del sistema redox del protozoo. Tras la difusión pasiva del fármaco al interior del parásito y del hidrogenosoma, se generan aniones nitrorradicales y otros intermediarios reactivos reducidos (Figura 15) (Dunne et al., 2003). Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual estos compuestos ejercen su acción, se sabe que inhiben la tioredoxina reductasa de *T. vaginalis* (TvTrxR) (Leitsch et al., 2009), formando aductos con residuos de cisteína de proteínas (como con la propia TvTrxR) y con grupos tiol libres presentes en la célula. Todo ello provoca una perturbación en el equilibrio redox del protozoo y compromete su viabilidad (Leitsch 2017). A pesar de su uso extendido a lo largo del tiempo en diferentes patologías, el MTZ ha seguido siendo un fármaco confiable para el tratamiento de la mayoría de infecciones tanto de patógenos anaerobios como microaerófilos, a diferencia de otros antimicrobianos frente a los que se han desarrollado resistencias más rápidamente (Holmes et al., 2016). Esto es debido a su mecanismo de acción pleiotrópico, es decir, multidiana, lo que hace difícil la aparición de resistencias en comparación con antibióticos monodiana. Sin embargo, no está exento de la aparición de estas, debido a mecanismos de reoxidación en condiciones aerobias de los radicales activos del MTZ (Rasoloson et al., 2001).

Debido a su reactividad con el ADN (LaRusso et al., 1978), el MTZ se asoció desde el principio con propiedades carcinogénicas y teratogénicas (Voogd 1981). Se observó que era carcinogénico en roedores a dosis altas y en periodos prolongados de tiempo. Sin embargo, en humanos el resultado fue menos claro, aunque si se ha podido establecer que en tratamientos a corto plazo no hay actividad carcinogénica (Dobiás et al., 1994; Falagas et al., 1998). No obstante, estudios más recientes no permiten descartar totalmente su papel como carcinógeno (Friedman et al., 2009). Con todo ello, aunque no se ha podido establecer el efecto teratogénico del MTZ (Koss et al., 2012), su capacidad para atravesar la barrera placentaria y para ser secretado en leche materna, hace que el MTZ sea categorizado como un fármaco de Categoría B, no recomendándose su uso en el embarazo ni en lactancia (Cudmore et al., 2004). La seguridad del TNZ en mujeres embarazadas no ha sido evaluada adecuadamente y también se ha observado su excreción en leche materna, recomendando posponer la lactancia hasta 72 horas tras la toma del TNZ (Cudmore et al., 2004). Las reacciones adversas documentadas a la administración de estos fármacos incluyen fiebre, urticaria, alteraciones neurológicas, angioedema y shock anafiláctico (Knowles et al., 1994; Asensio-Sánchez et al., 2008). Además, se ha descrito hipersensibilidad mediada por IgE al MTZ, que con frecuencia ocurre en conjunto con la hipersensibilidad al TNZ, debido a la similitud estructural de los compuestos (Helms et al., 2008). En estos casos, los pacientes deben ser sometidos a métodos de desensibilización al MTZ, que consiste en administrar dosis crecientes del fármaco para favorecer la tolerabilidad al mismo bajo estricto control hospitalario (Gendelmal et al., 2014). En el caso de que estos métodos no funcionen, se recurre al uso de la paromicina (Nyirjesy et al., 1998) o el ácido bórico (Muzny et al., 2012) como tratamiento tópico de la tricomonosis.

“Debido a su reactividad con el ADN (LaRusso et al., 1978), el MTZ se asoció desde el principio con propiedades carcinogénicas y teratogénicas (Voogd 1981).”

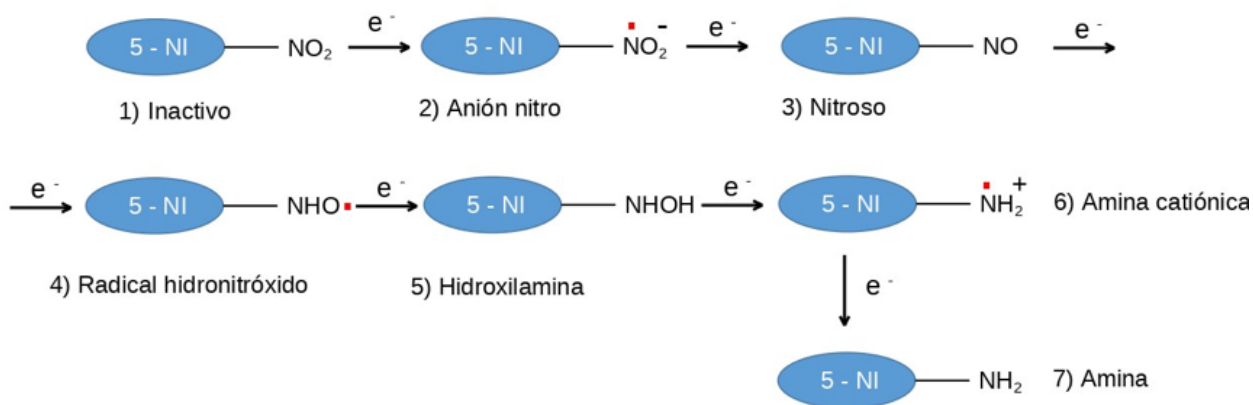


Figura 15. Reducción secuencial del grupo nitro de los fármacos 5-NI.

### 1.2.7.1. Mecanismo de acción del MTZ

El MTZ es absorbido por difusión pasiva en forma de profármaco (Edwards 1993). Su actividad comienza cuando el grupo nitro se reduce, transformándose en intermediarios reactivos (Dunne et al., 2003) capaces de reaccionar con diversas biomoléculas presentes en la célula (Müller y Gorrell 1983). Sin embargo, no está claro qué intermediario metabólico es el principal responsable de la actividad. Es importante destacar que el potencial de reducción redox del MTZ es muy bajo (-486 mV) (Smith y Edwards 1995), lo que resulta en una reducción mínima del fármaco en aerobios, ya que es menor que el potencial de reducción redox de NADPH y NADH (aproximadamente -320 mV cada uno). Cabe destacar que el TNZ y el secnidazol poseen potenciales redox mayores que el MTZ y por tanto son más fácilmente reducibles, por lo que pueden actuar mejor en asilados resistentes. Además, en presencia de oxígeno, la forma aniónica del MTZ puede volver a oxidarse en una reacción redox cíclica (Mason y Holtzman 1975), generando aniones superóxido y restaurando el profármaco. Esto no sucede en el caso de organismos microaerófilos y anaerobios, donde las concentraciones intracelulares de oxígeno son inferiores y existen abundantes factores capaces de reducir al MTZ a su forma tóxica. La enzima inicialmente propuesta como relevante en la reducción del MTZ fue la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) (Lindmark y Müller 1976). Esta enzima transfiere electrones a través de grupos de hierro y azufre, desde el piruvato a la proteína transportadora de electrones ferredoxina, la cual también contiene grupos de hierro y azufre. La ferredoxina, con un potencial de reducción medio muy bajo (-430 mV), puede transferir electrones al grupo nitro del MTZ, generando aniones nitrorradicales (Moreno et al., 1983, 1984; Chapman et al., 1985; Lloyd y Pedersen 1985). Esta proteína existe en casi todos los anaerobios susceptibles a MTZ, con excepción de las bifidobacterias (Narikawa 1986). Sin embargo, en estudios posteriores, la regulación a la baja o incluso la desactivación de la PFOR en *T. vaginalis*, *T. foetus* y *B. fragilis*, tuvo un efecto mínimo en la susceptibilidad al MTZ (Sutak et al., 2004; Leitsch et al., 2009). Sin embargo, sí que pareció afectar a la susceptibilidad de *G. duodenalis* (Dan et al., 2000; Leitsch et al., 2009), lo que sugiere que la activación del MTZ puede variar en función del microorganismo. También se han descrito otras proteínas presentes en anaerobios y microaerófilos como las enzimas flavínicas y la xantina oxidasa, con capacidad de reducir el MTZ (Kedderis et al., 1988). Entre ellas destaca la tiorredoxina reductasa (TvTrxR) presente en *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. duodenalis* (Leitsch et al., 2007, 2009, 2011). Aunque también existen trabajos que describen la reducción no enzimática del MTZ mediada por restos de cisteína y hierro ferroso (Willson y Searle 1975). Por lo tanto, la reducción del MTZ se produce por diferentes vías, que implican diversas enzimas con poder reductor, así como componentes no enzimáticos presentes en las células. Esta activación multidireccional, reduce considerablemente la probabilidad de aparición de resistencias.

Las dianas de los metabolitos activos del MTZ también son variadas. Inicialmente se pensaba que el MTZ dañaba las hebras de ADN de las bacterias y protozoos (Ings et al., 1974; Plant y Edwards 1976). Posteriormente, se observó que también se producía la formación de aductos con nucleótidos (Ludlum et al., 1988) y con los restos de cisteína, tanto de proteínas, como de restos tiol no proteicos (Leitsch et al., 2007). Los restos de tiol no proteicos actúan como defensa del protozoo frente a las ROS, por lo que su agotamiento puede provocar estrés oxidativo (Leitsch et al., 2007, 2009, 2011). La formación de aductos de MTZ con cisteínas de proteínas afectan negativamente a la actividad de ciertas enzimas, como la actividad reductora de TvTrxR (Leitsch et al., 2007, 2009). El tratamiento con MTZ puede disminuir la actividad de esta enzima hasta un 40% en condiciones anaerobias y un 50% en microaerofilia (Leitsch 2007, 2017) Por tanto, TvTrxR es un caso especial en este contexto, ya que funciona como activador, pero también como diana del MTZ. TvTrxR fue identificado como diana del MTZ en cuatro parásitos microaerofílicos: *E. histolytica* (Leitsch et al., 2007), *T. vaginalis* (Leitsch et al., 2009), *Spironucleus vortens* (Williams et al., 2012) y *G. duodenalis* (Leitsch et al., 2012), mientras que las demás proteínas afectadas varían entre los diferentes parásitos. La mayoría de estas proteínas están relacionadas o interactúan con la tioredoxina (TvTrx), lo que subraya una correlación entre la acción del MTZ y el sistema de TvTrx – TvTrxR, implicado en la detoxificación de las ROS. Así mismo, también se ha demostrado como el fármaco interactúa con la enolasa, la malato deshidrogenasa y la ribonucleótido reductasa en *T. vaginalis* (Leitsch et al., 2009).

“*T. vaginalis* puede lidiar con las bajas concentraciones de oxígeno presentes en la vagina, que oscila entre 15-56  $\mu\text{M}$  (Wagner y Levin 1978; Mahajan et al., 2022) mediante la acción de diferentes enzimas, como las NADH y NADPH oxidasa y la superóxido dismutasa (Rasoloson et al., 2001). De hecho, concentraciones bajas de oxígeno (10-25  $\mu\text{M}$ ) pueden ser beneficiosas para el crecimiento de *T. vaginalis* (Paget y Lloyd 1990), mientras que concentraciones superiores a 60  $\mu\text{M}$  resultan tóxicas (Ellis et al., 1994).”

La resistencia al MTZ en *T. vaginalis* se da en la práctica clínica por mecanismos aerobios y se estima entre un 4,3 y un 9,6% (Marques-Silva et al., 2021). Este mecanismo de resistencia implica la reoxidación de los metabolitos tóxicos del MTZ a su forma inactiva, mediada por el O<sub>2</sub> (Upcroft y Upcroft 2001). *T. vaginalis* puede lidiar con las bajas concentraciones de oxígeno presentes en la vagina, que oscila entre 15-56  $\mu\text{M}$  (Wagner y Levin 1978; Mahajan et al., 2022) mediante la acción de diferentes enzimas, como las NADH y NADPH oxidasa y la superóxido dismutasa (Rasoloson et al., 2001). De hecho, concentraciones bajas de oxígeno (10-25  $\mu\text{M}$ ) pueden ser beneficiosas para el crecimiento de *T. vaginalis* (Paget y Lloyd 1990), mientras que concentraciones superiores a 60  $\mu\text{M}$  resultan tóxicas (Ellis et al., 1994). El aumento de la concentración de O<sub>2</sub> es debido a la deficiencia en los mecanismos de eliminación de esta molécula, lo que produce la reoxidación del MTZ, siendo el causante de la resistencia a este compuesto (Upcroft y Upcroft 2001). Sin embargo, esta deficiencia en la eliminación de oxígeno puede provocar que los aislados resistentes sean más susceptibles al estrés oxidativo (Ellis et al., 1994).

La tricomonosis resistente al MTZ suele ir asociada a la resistencia a otros 5-NI como el TNZ debido al fenómeno de resistencia cruzada (Schwebke y Burgess 2004; Tejman-Yarden et al., 2011). Esto es preocupante porque existen pocas alternativas terapéuticas fuera de esta familia de compuestos para tratar la tricomonosis. Si los tratamientos estándar recomendados por la OMS fracasan, se puede aumentar la dosis de MTZ o TNZ a 2 g al día durante una semana (WHO 2021b). Si se observa un nuevo fracaso en el tratamiento, en el caso de las mujeres se puede combinar dosis de 2 g diarios de TNZ durante una semana con 500 mg de TNZ intravaginal dos veces al día durante 14 días (Sobel et al., 2001). Ante un nuevo fracaso, se recurre a TNZ de 1 g tres veces al día con 4 gramos de crema intravaginal al 6,25% de paromomicina todas las noches durante 14 días (Nyirjesy et al., 2011). También se han estudiado otras alternativas por vía tópica, pero con un éxito inferior al 50%, como el ácido bórico, la pivodona yodada intravaginal, el clotrimazol (alternativa recomendada en el primer trimestre de embarazo), el ácido acético, la furazolidona, el nonoxinol-9 y el permanganato de potasio (Seña et al., 2014).

### 1.3. CRIBADO FARMACOLÓGICO

#### 1.3.1. Cribado *in vitro*

El cribado farmacológico *in vitro* es una herramienta esencial en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Consiste en la evaluación de la actividad de compuestos químicos y moléculas naturales sobre el organismo a estudiar (cribado fenotípico) (Ibáñez-Escribano et al., 2014, 2021, 2022) o sobre diana moleculares específicas (Palos et al., 2021), en condiciones controladas de laboratorio, utilizando sistemas biológicos aislados, como células o enzimas purificadas. Esta técnica permite identificar los compuestos que presentan la actividad deseada sobre el organismo o molécula en cuestión, lo que constituye el primer paso en la identificación de compuestos con potencial actividad. La idea base del cribado farmacológico es seleccionar los compuestos activos frente a un determinado agente, en este caso contra *T. vaginalis*, partiendo de compuestos con actividad desconocida. El cribado *in vitro* se realiza en un entorno altamente controlado, lo que permite una evaluación precisa de la actividad de los compuestos. El primer paso consiste en saber si las moléculas testadas son activas o perturban el crecimiento del agente objetivo. Esta actividad se evalúa mediante la medida de un parámetro específico, como la cuantificación de la población celular tras la exposición a diferentes compuestos o la liberación o inhibición de una proteína específica (Ibáñez-Escribano et al., 2014). Estos parámetros se miden utilizando diferentes técnicas, como el recuento hemocitométrico, espectroscopía o fluorimetría, que permiten una medición cuantitativa de la actividad de los compuestos (Kouznetsov et al., 2004; Campos-Alderete et al., 2005; Rocha et al., 2014; Ibáñez-Escribano et al., 2014, 2022). También se pueden realizar ensayos de inhibición enzimática específica frente a una diana molecular concreta contra la que se presupone que el compuesto puede tener actividad (Palos et al., 2021).

El cribado *in vitro* presenta una serie de ventajas en comparación con otras técnicas de cribado, como el cribado *in vivo*. En primer lugar, permite evaluar un gran número de compuestos de manera rápida y eficiente, lo que permite una selección temprana de los compuestos más prometedores. Además, el cribado *in vitro* es más económico y éticamente más aceptable que el cribado *in vivo*, ya que no se requieren animales para realizar los ensayos. Sin embargo, también existen limitaciones en el cribado *in vitro* que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, los resultados de este cribado no siempre se traducen en actividad biológica en un organismo completo, ya que los sistemas biológicos en los que se realiza el cribado *in vitro* pueden no ser representativos de la complejidad de los organismos vivos. Además, no tiene en cuenta la farmacocinética, la biodisponibilidad y la toxicidad de los compuestos, lo que puede limitar su eficacia en la selección de fármacos potenciales. Debido a estas limitaciones, es aconsejable combinar el cribado *in vitro* con otras técnicas de cribado, como el cribado *in vivo* o el cribado *in silico* para evaluar de manera más completa los compuestos estudiados.

### 1.3.1.1. Cribado en *T. vaginalis*

Existen diversos métodos que buscan evaluar la efectividad de los compuestos frente a *T. vaginalis in vitro*. No obstante, los resultados pueden variar debido a distintos protocolos de análisis, parámetros para cuantificar la actividad, condiciones de experimentación, concentraciones y tiempos de incubación. La metodología utilizada para buscar nuevos agentes tricomonocidas también puede variar, pero la mayoría de los protocolos tienen como fundamento la incubación de diferentes inóculos de trofozoítos de *T. vaginalis* junto a un compuesto a estudiar a diferentes concentraciones. Transcurrido un periodo de tiempo, que suele ser de 24 o 48 horas, se realiza una cuantificación de los trofozoítos vivos. Esta cuantificación puede ser llevada a cabo por diferentes métodos, como el recuento hemocitométrico (Kouznetsov et al., 2004; Rocha et al., 2014), el uso de colorantes específicos, o la cuantificación de productos procedentes del metabolismo del parásito, como el ácido láctico, primer mecanismo bioquímico descrito para evaluar la supervivencia de *T. vaginalis* (Escario 1985) o la fosfatasa ácida (Martínez-Grueiro et al., 2003). También se puede cuantificar enzimas secretadas por los trofozoítos viables, como la lactato deshidrogenasa (Tasca-Cargnin et al., 2012; Kramer et al., 2013), o la actividad enzimática del parásito mediante la incorporación de colorantes redox como el Alamar Blue® (Campos-Alderete et al., 2005) o la resazurina (Natto et al., 2012; Ibáñez-Escribano et al., 2014, 2022).

### 1.3.1.2. Citotoxicidad inespecífica

En los estudios de cribado *in vitro*, es necesario conocer el efecto citotóxico de los compuestos frente a células de mamífero. Se realizan pruebas de citotoxicidad inespecífica para evaluar la selectividad del compuesto frente al agente diana y determinar la seguridad de la molécula. Es habitual llevar a cabo estas pruebas en líneas celulares de mamíferos de manera paralela con las pruebas de cribado *in vitro* para determinar si una molécula es citotóxica (Ibáñez-Escribano et al., 2014, 2021, 2022; Fonseca-Berzal et al., 2022). Si se observa afectada la viabilidad en estas células, se concluye que la molécula no presenta una actividad parasitaria específica o selectiva. El objetivo principal de estas evaluaciones es identificar compuestos que presenten actividad contra el patógeno sin causar toxicidad inespecífica a las células del hospedador. Algunos grupos utilizan la actividad antiparasitaria *in vitro* y los resultados de citotoxicidad para determinar los compuestos antiparasitarios tóxicos, mientras que otros calculan el índice de selectividad (IS) (Ibáñez-Escribano et al., 2021), que es la relación entre la concentración citotóxica 50 (concentración que disminuye la población de células al 50%) (CC50) y la concentración inhibitoria 50 (concentración que disminuye la población del parásito al 50%) (CI50). Aunque no hay una línea celular específica que se use de manera estandarizada para los ensayos de citotoxicidad, desde el 2009, existe una normativa internacional (ISO 10993-5:2009) que recomienda el uso de ciertas líneas celulares como CCL 1 (clon 929 de la NCTC), CCL 163 (clon A31 procedente de Balb/3T3), CLC 171 (MRC-5), CCL 81 (células Vero), CCL 10 (BNHK-21 [C-13]) y V-79 379A de la ATCC (American Type Culture Collection).

Existen varios métodos para evaluar la citotoxicidad celular, siendo uno de los más utilizados el ensayo basado en el 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Gonzalez y Tarloff 2001). El ensayo con MTT se fundamenta en la capacidad de las células vivas para convertir la sal soluble de tetrazolio en un precipitado insoluble de formazán. Este precipitado, al ser solubilizado, emite una longitud de onda característica que se puede medir espectrofotométricamente (Mosmann 1983; Sariego et al., 2014). El ensayo del MTT es uno de los más populares para evaluar la viabilidad celular debido a su facilidad de uso y buena correlación con otros ensayos de citotoxicidad. No obstante, puede ser susceptible a la interferencia de algunos compuestos y requiere una incubación prolongada para obtener resultados precisos (Mosmann 1983; Hezarjaribi et al., 2022).

Otro método para evaluar la toxicidad celular es mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), que mide la cantidad de LDH que se libera en el medio de cultivo celular como resultado de la muerte celular. El nivel de citotoxicidad se puede calcular a partir de la cantidad de LDH que se libera y la actividad total de LDH en las células. Aunque este ensayo es sensible a los cambios en la integridad de la membrana celular, es posible que otros compuestos interfieran con su precisión (Kramer et al., 2013). Además, existen otros métodos para evaluar la toxicidad celular, como los colorantes redox, entre los que se incluyen el Alamar Blue® y la resazurina, los cuales han sido utilizados en diversos estudios (O'Brien et al., 2000; Hamid et al., 2004; Borra et al., 2009). Este método es sensible y fácil de realizar, y presenta una amplia gama de aplicaciones en el cribado de compuestos y la evaluación de la toxicidad celular (Ibáñez-Escribano et al., 2014).

Es importante tener en cuenta que las pruebas de citotoxicidad celular no son suficientes para evaluar completamente la seguridad de una sustancia química. Se deben realizar otras pruebas, como la evaluación de la toxicidad aguda y crónica, la genotoxicidad y la carcinogenicidad, para determinar la seguridad de una sustancia química en humanos. Además, es importante realizar pruebas de citotoxicidad en diferentes tipos celulares para evaluar la toxicidad potencial en diferentes tejidos. Aunque las pruebas de citotoxicidad celular son una herramienta importante en el cribado farmacológico para evaluar la toxicidad potencial de una sustancia química, es necesario utilizarlas en conjunto con otras pruebas y en diferentes tipos celulares para obtener una evaluación completa de la seguridad de una sustancia química (Whitebread et al., 2005).

“ Aunque las pruebas de citotoxicidad celular son una herramienta importante en el cribado farmacológico para evaluar la toxicidad potencial de una sustancia química, es necesario utilizarlas en conjunto con otras pruebas y en diferentes tipos celulares para obtener una evaluación completa de la seguridad de una sustancia química (Whitebread et al., 2005). ”

### 1.3.2. Cribado *in silico*

El cribado *in silico* es una herramienta poderosa para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, ya que puede acelerar el proceso de identificación de compuestos prometedores y reducir el número de pruebas necesarias para evaluar la actividad y la seguridad de los compuestos candidatos. Estas técnicas virtuales se han convertido en una parte esencial del proceso moderno de desarrollo de fármacos y se espera que desempeñe un papel cada vez más importante en la búsqueda de nuevos tratamientos para diferentes enfermedades. El uso del cribado computacional tiene varias ventajas, comparado con otros métodos tradicionales. En primer lugar, permite la identificación de compuestos prometedores en una etapa temprana del proceso de desarrollo de fármacos, incluso antes de que estos hayan sido sintetizados, lo que permite evaluar bibliotecas químicas de órdenes de magnitud mayores que el cribado empírico, reduciendo el tiempo y los costes asociados con la investigación y síntesis de compuestos (Shoichet et al., 2002; Shoichet 2004). Además, permite identificar las moléculas con mayor potencial terapéutico, reduciendo el número de moléculas que requieren pruebas adicionales de estudios *in vitro* e *in vivo*. Esto reduce drásticamente el tiempo dedicado en los ensayos *in vitro* y el uso de animales de laboratorio (Shoichet 2004). También puede ser utilizado para optimizar la actividad y afinidad de los compuestos ya probados.

Existen diversas técnicas de cribado virtual en la actualidad. Una de las primeras en ser utilizada fue el diseño de fármacos basado en la estructura (Beddell et al., 1976), y en la actualidad es un componente importante del proceso de descubrimiento de fármacos mediante el diseño racional de ligandos basado en estructuras proteicas de resolución atómica (Sledz y Cafisch 2018). El acoplamiento molecular o *docking* utiliza herramientas de modelado molecular y simulaciones computacionales para evaluar la capacidad de diferentes ligandos de interactuar con la diana estudiada, provenientes de bibliotecas químicas, y/o modelar interacciones proteína-ligando en la optimización de compuestos líder (Kitchen et al., 2004; Shoichet 2004). Este método permite predecir cómo se unen los ligandos a los receptores, pronosticando la orientación y conformación de los mismos, en el sitio de unión de la proteína. El proceso se divide en dos etapas: el muestreo y la puntuación. En la etapa de muestreo, se generan múltiples posibles conformaciones y ubicaciones del ligando en la superficie del receptor, lo que da lugar a miles de posibles complejos. En la etapa de puntuación, se evalúa la afinidad del ligando y se selecciona la estructura más probable del complejo. Para estimar la afinidad de unión, se utilizan funciones de puntuación simplificadas, basadas en la física o calibradas con datos experimentales (Kitchen et al., 2004). DOCK fue uno de los primeros programas de acoplamiento, desarrollado en la década de 1980 para predecir complejos proteína-ligando de forma computacional (Kuntz et al., 1982). En la actualidad, existen varios programas de acoplamiento con diferentes algoritmos de muestreo y funciones de puntuación, siendo los más utilizados AutoDock 4 (AD4) y AutoDock Vina (Vina), por su fiabilidad en los resultados y por ser de acceso libre.

El *docking* es un método efectivo para filtrar ligandos poco probables de grandes bibliotecas químicas y seleccionar los compuestos con mayor probabilidad de ser activos entre los mejores clasificados. Los algoritmos de acoplamiento molecular buscan predecir tanto el modo de unión de un ligando, como la afinidad del complejo a partir de una estructura proteica. Sin embargo, los métodos de acoplamiento necesitan sacrificar la precisión por la velocidad para poder cribar grandes bibliotecas químicas, y las funciones de puntuación de acoplamiento no pueden predecir las afinidades de los ligandos con alta precisión (Warren et al., 2006). Para poder examinar grandes bibliotecas químicas, los programas de acoplamiento hacen numerosas simplificaciones en las etapas de muestreo y puntuación. Por lo general, la flexibilidad de la proteína se ignora completamente. Aunque se considera que el ligando es flexible, el espacio de búsqueda se restringe a un volumen predefinido del receptor y solo se exploran un conjunto limitado de conformaciones. La función de puntuación de acoplamiento estima la afinidad del ligando basándose en una sola estructura del complejo, lo que implica una descripción aproximada de los términos energéticos que contribuyen a la unión del ligando. Los términos que capturan las interacciones receptor-ligando, como los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, y las interacciones electrostáticas son los principales componentes de todas las funciones de puntuación. Sin embargo, no se describen con precisión varias interacciones entre el soluto y el solvente (como la desolvatación del sitio de unión) e interacciones entrópicas (como la restricción de la flexibilidad del ligando y del sitio de unión en el complejo) a la unión del ligando (Pantsar y Poso 2018). Es importante tener en cuenta que la mayoría de esos ligandos serán inactivos, y una tasa de éxito del 5% al 10% en la identificación de compuestos activos evaluados experimentalmente es considerado como exitoso (Shoichet et al., 2002; Irwin y Shoichet 2016). A pesar de la alta tasa de falsos positivos, es capaz de identificar nuevos ligandos para objetivos importantes y se ha convertido en una herramienta complementaria a otros métodos de descubrimiento de cabezas de familia de compuestos, como el cribado de alto rendimiento (Irwin y Shoichet 2016). Si se lograra esta predicción con alta precisión, se revolucionaría el descubrimiento de fármacos dirigidos, ya que los compuestos con las afinidades más altas serían identificados rápidamente sin necesidad de realizar el cribado experimental (Shoichet et al., 2002; Shoichet et al., 2004).

Existen diversas técnicas para mejorar las predicciones de unión de ligandos. Una de ellas es el uso de técnicas de consenso, que involucra la combinación de diferentes métodos para mejorar la precisión de la predicción, ser más rigurosos en la selección de bibliotecas examinadas o filtros como las huellas de interacción (Feher 2006; Marcou y Rognan 2007). La plasticidad del receptor puede considerarse parcialmente, tratando las cadenas laterales como flexibles o realizando el acoplamiento a varias conformaciones de la proteína (Totrov y Abagyan 2008; Ravindranath et al., 2015).

### 1.3.3. Mecanismos de acción

El mecanismo de acción (MdA) de un compuesto hace referencia a la manera en que una sustancia ejerce su efecto sobre un organismo o sistema biológico específico, lo cual implica la comprensión de cómo interactúa el compuesto y cuáles son los procesos biológicos relevantes para producir su acción. Una vez identificado un compuesto que muestra actividad frente a un determinado objetivo terapéutico, es importante comprender cómo éste ejerce su acción a través de las interacciones moleculares específicas que ocurren entre la molécula y el objetivo.

El conocimiento del MdA es fundamental para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos, ya que permite identificar los blancos moleculares y los procesos biológicos que se deben afectar para lograr el efecto terapéutico deseado, y también es crucial para la optimización del diseño de fármacos y para evitar posibles efectos secundarios (Kitchen et al., 2004; Shoichet 2004). Además, el conocimiento del MdA de un compuesto puede ayudar a predecir la eficacia y la seguridad de este, así como su potencial para interactuar con otros medicamentos o sustancias y a identificar posibles dianas terapéuticas adicionales para su uso en otras enfermedades.

“El conocimiento del MdA es fundamental para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos, ya que permite identificar los blancos moleculares y los procesos biológicos que se deben afectar para lograr el efecto terapéutico deseado, ”

El conocimiento del MdA puede obtenerse a través de una variedad de técnicas experimentales, como estudios de cinética enzimática, de inhibición enzimática (Palos et al., 2021), ensayos de unión de ligandos, microscopía de fluorescencia, técnicas de cristalografía de rayos X, lectura de placas en fluorímetro, marcaje con sondas específicas (Huang et al., 2015) o métodos de predicción *in silico* entre otras. Además, el cribado virtual basado en acoplamiento molecular (*docking*) también se ha utilizado para predecir posibles mecanismos de acción de nuevos compuestos antes de la síntesis y la prueba experimental (Shoichet et al., 2002; Shoichet et al., 2004).

#### 1.3.3.1. Alteración del potencial de membrana hidrogenosomal

La alteración del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es un evento crucial en la respuesta celular a diferentes estímulos, interviniendo en muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la apoptosis, la necrosis, la disfunción mitocondrial y la enfermedad (Chistiakov et al., 2017). Sus alteraciones tienen implicaciones en la producción de energía de las células, así como en la generación de ROS. Por otro lado, se ha comprobado que las fluctuaciones en el mismo podrían estar relacionadas con enfermedades como el cáncer, la diabetes y la enfermedad de Parkinson. Es por ello, que las fluctuaciones en el  $\Delta\Psi_m$  pueden tener implicaciones significativas para la función celular y se consideran un reflejo de la salud y el estado funcional de las mitocondrias (Elefantova et al., 2018; Teodoro et al., 2019). En definitiva, el potencial de membrana mitocondrial es un importante indicador del estado metabólico funcional de las mitocondrias y por tanto de la salud celular. En esta línea, ya se ha comprobado que varias sustancias, como compuestos antitumorales, antimicrobianos o antivirales, pueden afectar el  $\Delta\Psi_m$  para inducir la muerte celular, por lo que su medida nos proporciona una valiosa herramienta para evaluar la calidad mitocondrial y la respuesta celular, y su investigación puede proporcionar información importante para el desarrollo de nuevas terapias frente a diferentes enfermedades (Ganta et al., 2017; Oliveira et al., 2019).

Como se ha explicado en apartados anteriores, *T. vaginalis* carece de mitocondrias y, en su lugar, posee un orgánulo inusual involucrado en el catabolismo de carbohidratos: el hidrogenosoma. Este orgánulo es el lugar donde se produce la oxidación fermentativa del piruvato, acoplado a la producción de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato, pero carecen de los complejos de la cadena respiratoria, la ATP sintasa FoF1, el ciclo del ácido cítrico y otras funciones mitocondriales (Quon et al., 1992). Los hidrogenosomas están limitados por una doble membrana, similar a la de las mitocondrias; sin embargo, la membrana interna no forma crestas (Benchimol 2009). Los hidrogenosomas juegan un papel esencial en la susceptibilidad a los fármacos de *T. vaginalis* (Quon et al., 1992). Se ha demostrado que algunos compuestos con actividad frente a este parásito pueden alterar el potencial de membrana hidrogenosomal ( $\Delta\Psi_h$ ), lo que conduce a la disrupción de la función de este orgánulo y, finalmente, a la muerte celular. La alteración de este potencial de membrana es un mecanismo que se ha propuesto como posible diana terapéutica contra *T. vaginalis* en diversos estudios. Estos estudios sugieren que la alteración de este potencial puede ser una estrategia prometedora para el diseño de nuevos compuestos con actividad tricomocida, con alta eficacia y selectividad. Algunos compuestos evaluados en *T. vaginalis* que han demostrado causar alteración en el potencial de membrana de este orgánulo son: la tetraciclina, el metil jasmonato y el resveratrol.

El tratamiento de los parásitos con tetraciclina (TET) mostró una disminución del  $\Delta\Psi_h$  de más de un 50% respecto al control de crecimiento a una concentración de 700  $\mu\text{g/mL}$ , produciendo una disfunción en el orgánulo y una afectación en la viabilidad del parásito, provocando muerte celular con características similares a los procesos de apoptosis. La exposición de *T. vaginalis* a TET produjo fragmentación hidrogenosomal y del ADN, además de la diseminación del material genético por el núcleo, y un aumento de ROS (Huang et al., 2015). Este equipo también detectó la sobreexpresión de diferentes genes, especialmente los implicados en el metabolismo de carbohidratos, mientras que los encargados de la replicación y la reparación del ADN fueron regulados a la baja, así como los relacionados con la protección antioxidante del parásito. También inhibió la expresión de los genes de la NADH deshidrogenasa y la ferredoxina, implicados en el transporte redox en el hidrogenosoma.

El metil jasmonato es un extracto natural que ha demostrado tener capacidad para alterar el potencial mitocondrial en células cancerosas. Al ser ensayado frente a *T. vaginalis*, se observaron modificaciones morfológicas en los hidrogenosomas mediante microscopía de transmisión. Además, mediante el uso de microscopía electrónica en presencia de la sonda JC-1, se apreció la alteración del  $\Delta\Psi_h$  mediante la emisión de una intensa fluorescencia verde debido a los J-monómeros de esta sonda, lo que indica una disfunción en el potencial de membrana de este orgánulo (Vilella et al., 2009).

De igual manera, el resveratrol (RESV) también mostró actividad sobre el potencial de membrana del hidrogenosoma. Se observó una disminución significativa de este potencial dosis-dependiente tras dos horas de incubación, produciendo una perturbación metabólica del hidrogenosoma y un estrés bioenergético en el protozoo. También aumento la expresión de la enzima hidrogenosomal PFOR y la reducción de la síntesis de la hidrogenasa. Los resultados sugieren que el RESV induce cambios en el metabolismo del hidrogenosoma, pudiendo estar relacionado con la inducción del estrés oxidativo, un fenómeno que se ha detectado en otros parásitos tratados con este extracto, pero no en el caso de *T. vaginalis* (Mallo et al., 2013). Estos autores también reportaron la sobreexpresión de la proteína de choque térmico Hsp70, implicada en la homeostasis hidrogenosomal, lo que puede estar relacionado con un intento del parásito de protegerse frente al daño hidrogenosomal.

“

*El metil jasmonato es un extracto natural que ha demostrado tener capacidad para alterar el potencial mitocondrial en células cancerosas.*

”

### 1.3.3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno y un electrón desapareado en su órbita externa. Bajo circunstancias normales, las células generan una cantidad equilibrada de ROS como subproducto del metabolismo normal, las cuales son producidas por casi todos los tipos de células (Bedard y Krause 2007). El oxígeno tiene diversos estados redox, entre ellos el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), el oxígeno singlete (1O<sub>2</sub>) y el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), los cuales son producidos por células (Moskovitz et al., 2002; Yang y Lian 2019). Las ROS desempeñan un papel crucial en la resistencia a patógenos y la señalización celular, y también juegan un papel importante en diversos procesos de homeostasis relacionados con el metabolismo, la inmunidad, el crecimiento y la diferenciación celular (Shadel y Horvath 2015). A pesar de ello, también se reconocen ampliamente como partículas peligrosas para la célula, ya que dañan proteínas intracelulares, lípidos y ácidos nucleicos. Esto suele presentarse en procesos patológicos cuando no se eliminan a tiempo (Nathan et al., 2013). Las ROS son producidas en situaciones de alta demanda energética, y cuando se producen en exceso, provocan daño oxidativo en el cuerpo y en los patógenos.

La cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes de ROS en las células. Durante el metabolismo normal del oxígeno, la síntesis de ATP genera ROS. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, se consideran subproductos que se producen durante el suministro de energía a las actividades celulares (Bedard y Krause 2007). Sin embargo, su producción es excesiva en situaciones de estrés oxidativo, ocasionando un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del cuerpo celular para neutralizar sus efectos perjudiciales. El exceso de ROS puede alterar las células y provocar daño, tanto en el ADN como en proteínas y lípidos (Yang y Lian 2019). En definitiva, hay muchas patologías, como enfermedades neurodegenerativas, SIDA, lesiones cerebrales isquémicas o traumáticas, cáncer, diabetes, lesiones hepáticas, e incluso el proceso de envejecimiento, que se han relacionado con el estrés oxidativo (Halliwell 2001; Moskovitz et al., 2002; Yang y Lian 2019).

Esta correlación entre el estrés oxidativo y la patología ha llevado a los investigadores a intentar comprender los mecanismos y el papel que juegan estas especies reactivas en las enfermedades. Así, parece que las ROS influyen principalmente a través de su función como moléculas de señalización y oxidantes, interfiriendo en la supervivencia celular y causan daño oxidativo. Otras de las posibles acciones de los compuestos reactivos del oxígeno, es impulsar la defensa inmunológica, mantener el equilibrio metabólico, así como disipar el calor; de modo que las múltiples funciones de ROS en el biosistema hacen que puedan influir en cada patología desde diferentes perspectivas (Yang y Lian, 2019).

En el caso que nos ocupa, las ROS intervienen en la patogénesis de *T. vaginalis*, ya que este protozoo genera una cantidad significativa de estas especies reactivas en su proceso de infección, que puede causar daño celular y contribuir a la patogenicidad del parásito (Song et al., 2007; Gao et al., 2021). Esta producción de ROS por *T. vaginalis*, parece que es una respuesta adaptativa a las condiciones anaeróbicas en las que vive este protozoo, produciéndose principalmente a través del proceso de respiración anaerobia incompleta producida en el hidrogenosoma. *T. vaginalis* posee una cascada de defensa frente a las ROS, que comienza con la reducción de la enzima tiorredoxina (TvTrx) por parte de la tiorredoxin reductasa (TvTrxR). TvTrx reducida, bioactiva a la tiorredoxin peroxidasa (TvTrxP) y a la tiol peroxidasa (TvTprx) que se encargan de la detoxificación de los radicales de oxígeno (Coombs et al., 2004; Leitsch et al., 2009). Por estas razones, la detección de ROS se ha utilizado en el desarrollo de nuevos fármacos frente a este protozoo, siendo útil, tanto a la hora de evaluar la eficacia de nuevos compuestos en el tratamiento de infecciones por el parásito, como para identificar los mecanismos de acción de los fármacos tricomonocidas ya existentes (Huang et al., 2015).

### 1.3.3.3. Acoplamiento molecular

Dentro del cribado virtual destaca la técnica del acoplamiento molecular, que se ha convertido en una herramienta fundamental para la química computacional y el diseño de fármacos, ya que es crucial en la identificación y predicción de la manera en la que los ligando interactúan con proteínas receptoras. Mediante simulaciones computacionales, se pretende anticipar la orientación y conformación (pose) de un ligando dentro de una cavidad de la proteína (Kitchen et al., 2004; Trott y Olson 2009).

El acoplamiento se puede dividir en dos etapas:

- **Muestreo de la pose:** Se predice la orientación y conformación correcta de la pequeña molécula (ligando) dentro de la cavidad del receptor (normalmente una proteína) (Kitchen et al., 2004; Warren et al., 2006)
- **Clasificación de la pose:** Una vez identificadas diversas poses, se seleccionan y clasifican las más probables en base a criterios biofísicos. Las funciones de puntuación asignan valores numéricos a diferentes configuraciones de ligando-receptor para predecir la afinidad de unión o la estabilidad de una interacción. Cuánto más bajo sea el resultado de la puntuación, más favorable es generalmente la interacción (Kitchen et al., 2004; Warren et al., 2006).

Las funciones de puntuación ocupan un papel central para esta clasificación y estas pueden variar en forma y parámetros para cada programa utilizado (Trott y Olson 2009; Koes et al., 2013). Estas funciones asignan valores numéricos a distintas configuraciones ligando-receptor para predecir la afinidad de unión o la estabilidad de la interacción entre las moléculas involucradas, donde un valor de puntuación más bajo suele indicar una interacción más favorable. Comúnmente incluyen interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno (Ewing et al., 2001; Case et al., 2005) (Tabla 3). Las funciones de puntuación pueden basarse en campos de fuerza, donde el valor de interacción se obtiene a través de un conocimiento teórico o mediante métodos empíricos, donde se valora el conocimiento de interacciones ya conocidas.

- **Campos de fuerza:** Conjuntos de ecuaciones y parámetros usados en simulaciones moleculares para modelar interacciones atómicas y moléculas. Los campos de fuerza contienen términos para interacciones como enlaces covalentes, ángulos, torsiones y fuerzas no covalentes (como interacciones de van der Waals y electrostáticas). Los campos de fuerza también tienen importancia en la preparación de las proteínas y los ligandos en los pasos previos al acoplamiento (Case et al., 2005).
- **Empírico:** En este contexto, se refiere a la incorporación de datos experimentales, reglas heurísticas, y otras informaciones específicas (por ejemplo, ciertas interacciones conocidas ya en otras proteínas) que no están necesariamente contenidas en un campo de fuerza típico (Wang et al., 2002; Korb et al., 2009; Koes et al., 2013).

Sin embargo, el desarrollo de funciones de puntuación empíricas (Wang et al., 2002; Korb et al., 2009), que combinan elementos de campos de fuerza (basados en principios teóricos puros de interacciones moleculares) y conocimiento (basado en información derivada de resultados experimentales y bases de datos), están al alza, ya que ofrecen una parametrización más detallada y adaptativa (Korb et al., 2009). Estas funciones buscan reproducir afinidades de unión y poses ya conocidas, y pueden detectar elementos de unión que no se detectan mediante funciones basadas en el campo de fuerza (como alguna interacción hidrofóbica o fuerzas de desolvatación) (Wang et al., 2002; Korb et al., 2009; Koes et al., 2013). La combinación de estos elementos significa que la función de puntuación no solo se basa en la física y la química teóricas, sino que también integra información específica y práctica derivada de la investigación experimental. Esta combinación de enfoques teóricos y empíricos brinda más adaptabilidad y precisión a las que se obtiene con un enfoque teórico o empírico en particular.

Tipo de interacción	Orden de fuerza
Enlace covalente	Muy fuerte
Interacciones iónicas (Puente de sal)	Fuerte
Interacción Pi-Pi (Ej: Aromático – Aromático)	Moderada
Enlaces de hidrógeno	Moderada
Interacción Pi-Catión (Ej: Aromático – grupo amonio)	Moderada
Interacción de Van der Waals	Débil
Interacciones Hidrofóbicas	Débil

**Tabla 3.** Interacciones valoradas en el acoplamiento molecular y su fuerza relativa.

## 2 BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, D. R., Martul, R., Alvarez, M. V., López Zumel, M. C., & Espada, M. (1991). Synthesis of 1- substituted nitroimidazoles and its evaluation as radiosensitizing agents. *Acta científica venezolana*, 42(5), 257–265.
2. Aguilera, E., Varela, J., Birriel, E., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., de Bilbao, N. V., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Díaz Mazariegos, S., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Minini, L., Merlino, A., Cerecetto, H., González, M., & Alvarez, G. (2016). Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: Inhibition of parasite growth through multitarget activity. *ChemMedChem*, 11(12), 1328– 1338. Doi: 10.1002/cmdc.201500385.
3. Akiyama, S.-I. (1987). HeLa cell lines. En *Methods in Enzymology* (pp. 38–50). Elsevier.
4. Alderete, J. F., Engbring, J., Lauriano, C. M., & O'Brien, J. L. (1998). Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microbial Pathogenesis*, 24(1), 1–16. Doi: 10.1006/mpat.1997.0167
5. Alkhalidi, A. A. M., Creek, D. J., Ibrahim, H., Kim, D.-H., Quashie, N. B., Burgess, K. E., Changtam, C., Barrett, M. P., Suksamrarn, A., & de Koning, H. P. (2015). Potent trypanocidal curcumin analogs bearing a monoenone linker motif act on *Trypanosoma brucei* by forming an adduct with trypanothione. *Molecular Pharmacology*, 87(3), 451–464. Doi: 10.1124/mol.114.096016
6. Allsworth, J. E., Ratner, J. A., & Peipert, J. F. (2009). Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sexually Transmitted Diseases*, 36(12), 738–744. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181b38a4b
7. Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, G. V., Lavaggi, M. L., Porcal, W., Di Maio, R., González, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, M. T., & Gómez-Puyou, A. (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 5767–5772. Doi: 10.1016/j.ejmech.2010.09.034
9. Alvarez-Sánchez, M. E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, 28(4), 193–202. Doi: 10.1006/mpat.1999.0336
10. Alves, M. S. D., das Neves, R. N., Sena-Lopes, Â., Domingues, M., Casaril, A. M., Segatto, N. V., Nogueira, T. C. M., de Souza, M. V. N., Savegnago, L., Seixas, F. K., Collares, T., & Borsuk, S. (2020). Antiparasitic activity of furanyl N-acyl-hydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: in vitro and in silico analyses. *Parasites & Vectors*, 13(1), 59. Doi: 10.1186/s13071-020- 3923-3928
11. Arroyo, R., Engbring, J., & Alderete, J. F. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, 6(7), 853–862. Doi: 10.1111/j.1365- 2958.1992.tb01536.x
12. Asensio Sánchez, T., Dávila, I., Moreno, E., Laffond, E., Macías, E., Ruiz, A., & Lorente, F. (2008). Anaphylaxis due to metronidazole with positive skin prick test. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology: Official Organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, 18(2), 138–139. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18447147/>
13. Bachmann, L. H., Hobbs, M. M., Seña, A. C., Sobel, J. D., Schwabke, J. R., Krieger, J. N., McClelland, R. S., & Workowski, K. A. (2011). *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53 Suppl 3(suppl\_3), S160-72. Doi: 10.1093/cid/cir705.
14. Bahadory, S., Aminizadeh, S., Taghipour, A., Bokharaei-Salim, F., Khanaliha, K., Razizadeh, M. H., Soleimani, A., Beikzadeh, L., & Khatami, A. (2021). A systematic review and meta-analysis on the global status of *Trichomonas vaginalis* virus in *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis*, 158(105058), 105058. Doi: 10.1016/j.micpath.2021.105058
15. Bala, V., Mandalapu, D., Gupta, S., Jangir, S., Kushwaha, B., Chhonker, Y. S., Chandasana, H., Krishna, S., Rawat, K., Krishna, A., Singh, M., Sankhwar, S. N., Shukla, P. K., Maikhuri, J. P., Bhatta, R. S., Siddiqi, M. I., Tripathi, R., Gupta, G., & Sharma, V. L. (2015). N-Alkyl/aryl-4-(3-substituted-3- phenylpropyl)piperazine-1-carbothioamide as dual-action vaginal microbicides with reverse transcriptase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 640–650. Doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.021
16. Bandea, C. I., Joseph, K., Secor, E. W., Jones, L. A., Igietseme, J. U., Sautter, R. L., Hammerschlag, M. R., Fajman, N. N., Girardet, R. G., & Black, C. M. (2013). Development of PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1298–1300. Doi: 10.1128/JCM.03101-12
17. Barea, C., Pabón, A., Castillo, D., Zimic, M., Quiliano, M., Galiano, S., Pérez-Silanes, S., Monge, A., Deharo, E., & Aldana, I. (2011). New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1,4- di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(15), 4498–4502. Doi: 10.1016/j.bmcl.2011.05.125

18. Barea, C., Pabón, A., Pérez-Silanes, S., Galiano, S., Gonzalez, G., Monge, A., Deharo, E., & Aldana, I. (2013). New amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide with leishmanicidal and antiplasmodial activities. *Molecules* 18(4), 4718–4727. Doi: 10.3390/molecules18044718
19. Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, C. Y., Colocoussi, A., & Johnson, P. J. (2005a). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1951–1958. Doi: 10.1128/EC.4.11.1951-1958.2005
20. Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, C. Y., Colocoussi, A., & Johnson, P. J. (2005b). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1951–1958. Doi: 10.1128/EC.4.11.1951-1958.2005
21. Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. Doi: 10.1152/physrev.00044.2005
22. Beddell, C. R., Goodford, P. J., Norrington, F. E., Wilkinson, S., & Wootton, R. (1976). Compounds designed to fit a site of known structure in human haemoglobin. *British Journal of Pharmacology*, 57(2), 201–209. Doi: 10.1111/j.1476-5381.1976.tb07468.x
23. Belfort, I. K. P., Cunha, A. P. A., Mendes, F. P. B., Galvão-Moreira, L. V., Lemos, R. G., de Lima Costa, L. H., Monteiro, P., Ferreira, M. B., Dos Santos, G. R. B., Costa, J. L., de Sá Ferreira, A., Brito, L. G. O., Brito, L. M. O., Vidal, F. C. B., & Monteiro, S. C. M. (2021). *Trichomonas vaginalis* as a risk factor for human papillomavirus: a study with women undergoing cervical cancer screening in a northeast region of Brazil. *BMC Women's Health*, 21(1), 174. Doi: 10.1186/s12905-021-01320-6
24. Benchimol, M., Ribeiro, K. C., Mariante, R. M., & Alderete, J. F. (2001). Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *European Journal of Cell Biology*, 80(9), 593–607. Doi: 10.1078/0171-9335-00191
25. Benchimol, Marlene. (2004). Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 10(5), 528–550. Doi: 10.1017/S1431927604040905
26. Benchimol, Marlene. (2008). The hydrogenosome as a drug target. *Current Pharmaceutical Design*, 14(9), 872–881. Doi: 10.2174/138161208784041114
27. Benchimol, Marlene. (2009). Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue & Cell*, 41(3), 151–168. Doi: 10.1016/j.tice.2009.01.001
28. Benítez, D., Cabrera, M., Hernández, P., Boiani, L., Lavaggi, M. L., Di Maio, R., Yaluff, G., Serna, E., Torres, S., Ferreira, M. E., Vera de Bilbao, N., Torres, E., Pérez-Silanes, S., Solano, B., Moreno, E., Aldana, I., López de Ceráin, A., Cerecetto, H., González, M., & Monge, A. (2011). 3- trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-*T. cruzi* agents and mechanism of action studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(10), 3624– 3636. Doi: 10.1021/jm2002469
29. Benítez-Cardoza, C. G., Brieba, L. G., Arroyo, R., Rojo-Domínguez, A., & Vique-Sánchez, J. L. (2021). Triosephosphate isomerase as a therapeutic target against trichomoniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 246, 111413. Doi: 10.1016/j.molbiopara.2021.111413
30. Boris, S., & Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*, 2(5), 543–546. Doi: 10.1016/s1286-4579(00)00313-0
31. Borra, R. C., Lotufo, M. A., Gagioti, S. M., Barros, F. de M., & Andrade, P. M. (2009). A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, 23(3), 255–262. Doi: 10.1590/s1806-83242009000300006
32. Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J. H., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A., & Hackstein, J. H. P. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, 434(7029), 74–79. Doi: 10.1038/nature03343
33. Boxma, B., Voncken, F., Jannink, S., van Alen, T., Akhmanova, A., van Weelden, S. W. H., van Hellemond, J. J., Ricard, G., Huynen, M., Tielens, A. G. M., & Hackstein, J. H. P. (2004). The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1389–1399. Doi: 10.1046/j.1365- 2958.2003.03912.x
34. Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E., & Johnson, P. J. (1997). Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *The EMBO Journal*, 16(12), 3484–3493. Doi: 10.1093/emboj/16.12.3484
35. Bratt, K., Sunnerheim, K., Bryngelsson, S., Fagerlund, A., Engman, L., Andersson, R. E., & Dimberg, L. H. (2003). Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and Structure–Antioxidant activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 594–600. Doi: 10.1021/jf020544f

36. Brizuela, M., Huang, H. M., Smith, C., Burgio, G., Foote, S. J., & McMorran, B. J. (2014). Treatment of erythrocytes with the 2-cys peroxiredoxin inhibitor, conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PLoS One*, 9(4), e92411. Doi: 10.1371/journal.pone.0092411
37. Brotman, R. M., Shardell, M. D., Gajer, P., Fadrosch, D., Chang, K., Silver, M. I., Viscidi, R. P., Burke, A. E., Ravel, J., & Gravitt, P. E. (2014). Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause*, 21(5), 450–458. Doi: 10.1097/GME.0b013e3182a4690b
38. Campbell, L., Woods, V., Lloyd, T., Elsayed, S., & Church, D. L. (2008). Evaluation of the OSOM *Trichomonas* rapid test versus wet preparation examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3467–3469. Doi: 10.1128/jcm.00671-08
39. Campos Aldrete, M. E., Salgado-Zamora, H., Luna, J., Meléndez, E., & Meráz-Ríos, M. A. (2005). A high-throughput colorimetric and fluorometric microassay for the evaluation of nitroimidazole derivatives anti-trichomonas activity. *Toxicology in Vitro*, 19(8), 1045–1050. Doi: 10.1016/j.tiv.2005.04.007
40. Carapina da Silva, C., Pacheco, B. S., das Neves, R. N., Dié Alves, M. S., Sena-Lopes, Â., Moura, S., Borsuk, S., & de Pereira, C. M. P. (2019). Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 367–377. Doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.058
41. Cargnin, S. T., Vieira, P. de B., Cibulski, S., Cassel, E., Vargas, R. M. F., Montanha, J., Roehle, P., Tasca, T., & von Poser, G. L. (2013). Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitology International*, 62(2), 112–117. Doi: 10.1016/j.parint.2012.10.006
42. Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688. Doi: 10.1002/jcc.20290
43. Catterall, R. D., & Nicol, C. S. (1957). Systemic treatment of trichomonal infections. *British Medical Journal*, 2(5035), 29–31. Doi: 10.1136/bmj.2.5035.29
44. Cavalleri, B., Volpe, G., Arioli, V., Pizzocheri, F., & Diena, A. (1978). Synthesis and biological activity of new 2-nitroimidazole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 21(8), 781–784. Doi: 10.1021/jm00206a012
45. Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, 637(114449), 114449. Doi: 10.1016/j.ab.2021.114449
46. Changtam, C., de Koning, H. P., Ibrahim, H., Sajid, M. S., Gould, M. K., & Suksamrarn, A. (2010). Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(3), 941–956. Doi: 10.1016/j.ejmech.2009.11.035
47. Chapman, A., Cammack, R., Linstead, D., & Lloyd, D. (1985). The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. *Journal of General Microbiology*, 131(9), 2141–2144. Doi: 10.1099/00221287-131-9-2141
48. Cheng, G., Sa, W., Cao, C., Guo, L., Hao, H., Liu, Z., Wang, X., & Yuan, Z. (2016). Quinoxaline 1,4-di-N-oxides: Biological activities and mechanisms of actions. *Frontiers in pharmacology*, 7. Doi: 10.3389/fphar.2016.00064
49. Cheng, W.-H., Huang, K.-Y., Huang, P.-J., Hsu, J.-H., Fang, Y.-K., Chiu, C.-H., & Tang, P. (2015). Nitric oxide maintains cell survival of *Trichomonas vaginalis* upon iron depletion. *Parasites & Vectors*, 8(1). Doi: 10.1186/s13071-015-1000-5
50. Chistiakov, D. A., Shkurat, T. P., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2018). The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Annals of Medicine*, 50(2), 121–127. Doi: 10.1080/07853890.2017.1417631
51. Chu, Y.-F., Wise, M. L., Gulvady, A. A., Chang, T., Kendra, D. F., Jan-Willem van Klinken, B., Shi, Y., & O'Shea, M. (2013). In vitro antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of seven common oats. *Food Chemistry*, 139(1–4), 426–431. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.104
52. CLL Digital Archive. Chronicling the history of chronic lymphocytic leukemia scholarship: <https://clldigitalarchive.org/history/> (Consultado en mayo 2023).
53. Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C., & Müller, S. (2004a). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5249–5256. Doi: 10.1074/jbc.M304359200
54. Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C., & Müller, S. (2004b). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5249–5256. Doi: 10.1074/jbc.M304359200
55. Cores, Á., Abril, S., Michalska, P., Duarte, P., Olives, A. I., Martín, M. A., Villacampa, M., León, R., & Menéndez, J. C. (2021). Bisavenathramide analogues as Nrf2 inducers and neuroprotectors in *in vitro* models of oxidative stress and hyperphosphorylation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 941. Doi: 10.3390/antiox10060941

56. Cores, Á., Carmona-Zafra, N., Martín-Cámara, O., Sánchez, J. D., Duarte, P., Villacampa, M., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., León, R., & Menéndez, J. C. (2021). Curcumin-piperlongumine hybrids with a multitarget profile elicit neuroprotection in in vitro models of oxidative stress and hyperphosphorylation. *Antioxidants* 11(1), 28. Doi: 10.3390/antiox11010028
57. Cosar, C., & Julou, L. (1959). The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections. *Annales de l'Institut Pasteur*, 96(2), 238–241.
58. Coulthard, C. E., Hale, L. J., & Gurd, M. R. (1955). The treatment of experimental bacillary infections of mice with quinoxaline 1:4 Di-n-oxide. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 10(3), 394–396. Doi: 10.1111/j.1476-5381.1955.tb00890.x
59. Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., & Garber, G. E. (2004). Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 783–793. Doi: 10.1128/cmr.17.4.783-793.2004
60. Custodio, H. (2016). Protozoan parasites. *Pediatrics in Review*, 37(2), 59–71. Doi: 10.1542/pir.2015-0006
61. Dacks, J. B., Dyal, P. L., Embley, T. M., & van der Giezen, M. (2006). Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. *Gene*, 373, 75–82. Doi: 10.1016/j.gene.2006.01.012
62. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12), 3284–3301. Doi: 10.1021/ci500467k
63. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. Doi: 10.1038/srep42717
64. Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. Doi: 10.1002/cmdc.201600182
65. Dan, M., Wang, A. L., & Wang, C. C. (2000). Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Molecular Microbiology*, 36(2), 447–456. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01863.x
66. das Neves, R. N., Sena-Lopes, Â., Alves, M. S. D., da Rocha Fonseca, B., da Silva, C. C., Casaril, A. M., Savegnago, L., de Pereira, C. M. P., Ramos, D. F., & Borsuk, S. (2020). 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. *Parasitology Research*, 119(2), 725–736. Doi: 10.1007/s00436-019-06568-4
67. de Miguel, N., Lustig, G., Twu, O., Chattopadhyay, A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2010). Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(7), 1554–1566. Doi: 10.1074/mcp.M000022-MCP201
68. Diamantis, A., Magiorkinis, E., & Androutsos, G. (2009). Alfred François Donné (1801-78): a pioneer of microscopy, microbiology and haematology. *Journal of Medical Biography*, 17(2), 81–87. Doi: 10.1258/jmb.2008.008040
69. Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology*, 43(4), 488–490. Doi: 10.2307/3274682
70. Dobiás, L., Cerná, M., Rössner, P., & Srám, R. (1994). Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research*, 317(3), 177–194.
71. Dolezal, P., Dancis, A., Lesuisse, E., Sutak, R., Hrdý, I., Embley, T. M., & Tachezy, J. (2007). Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1431–1438. Doi: 10.1128/EC.00027-07
72. Duarte, M., Giordani, R. B., De Carli, G. A., Zuanazzi, J. A., Macedo, A. J., & Tasca, T. (2009). A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Experimental Parasitology*, 123(2), 195–198. Doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.002
73. Dunne, R. L., Dunn, L. A., Upcroft, P., O'Donoghue, P. J., & Upcroft, J. A. (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*, 13(4), 239–249. Doi: 10.1038/sj.cr.7290169
74. Durel, P., Roiron, V., Siboulet, A., & Borel, L. J. (1960). Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. *The British Journal of Venereal Diseases*, 36(1), 21–26. Doi: 10.1136/sti.36.1.21
75. Dyall, S. D., & Johnson, P. J. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 3(4), 404–411. Doi: 10.1016/s1369-5274(00)00112-0
76. Dyall, Sabrina D., Yan, W., Delgadillo-Correa, M. G., Luceford, A., Loo, J. A., Clarke, C. F., & Johnson, P. J. (2004). Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature*, 431(7012), 1103–1107. Doi: 10.1038/nature02990

77. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638. Doi: 10.1126/science.1110591
78. Egnatchik, R. A., Leamy, A. K., Noguchi, Y., Shiota, M., & Young, J. D. (2014). Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(2), 283–295. Doi: 10.1016/j.metabol.2013.10.009
79. Elefantova, K., Lakatos, B., Kubickova, J., Sulova, Z., & Breier, A. (2018). Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in L1210 cells with massive Overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1985. Doi: 10.3390/ijms19071985
80. Ellis, J. E., Yarlett, N., Cole, D., Humphreys, M. J., & Lloyd, D. (1994). Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology* 140 (9), 2489–2494. Doi: 10.1099/13500872-140-9-2489
81. Embley, T. M., & Hirt, R. P. (1998). Early branching eukaryotes? *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(6), 624–629. Doi: 10.1016/s0959-437x(98)80029-4
82. Engbring, J. A., & Alderete, J. F. (1998). Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Molecular Microbiology*, 28(2), 305–313. Doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00784.x
83. Escario, A., Gómez Barrio, A., Simons Diez, B., & Escario, J. A. (2010). Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Tropica*, 114(1), 22–30. Doi: 10.1016/j.actatropica.2009.12.002
84. Escario García-Trevijano, J. A. (1985). Actividad anti-protozoaria de moléculas de nueva síntesis. Universidad Complutense de Madrid.
85. Evaldson, G. R., Lindgren, S., Nord, C. E., & Rane, A. T. (1985). Tinidazole milk excretion and pharmacokinetics in lactating women. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19(4), 503–507. Doi: 10.1111/j.1365-2125.1985.tb02676.x
86. Ewing, T. J. A., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D. (2001). DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of computer-aided molecular design*, 15(5), 411–428. Doi: 10.1023/a:101115820450
87. Falagas, M. E., Walker, A. M., Jick, H., Ruthazer, R., Griffith, J., & Snyderman, D. R. (1998). Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clinical Infectious Diseases*: 26(2), 384–388. Doi: 10.1086/516306
88. Feher, M. (2006). Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discovery Today*, 11(9–10), 421–428. Doi: 10.1016/j.drudis.2006.03.009
89. Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Huang, B., Brooks, J. P., Glascock, A. L., Sheth, N. U., Vaginal Microbiome Consortium, Strauss, J. F., 3rd, Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014a). An emerging mycoplasma associated with trichomoniasis, vaginal infection and disease. *PLoS One*, 9(10), e110943. Doi: 10.1371/journal.pone.0110943
90. Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Huang, B., Brooks, J. P., Glascock, A. L., Sheth, N. U., Vaginal Microbiome Consortium, Strauss, J. F., 3rd, Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014b). An emerging mycoplasma associated with trichomoniasis, vaginal infection and disease. *PLoS One*, 9(10), e110943. Doi: 10.1371/journal.pone.0110943
91. Fichorova, R., Fraga, J., Rappelli, P., & Fiori, P. L. (2017). *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonasvirus* and *Mycoplasma*. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 882–891. Doi: 10.1016/j.resmic.2017.03.005
92. Fichorova, R. N. (2009). Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1–2), 185–189. Doi: 10.1016/j.jri.2009.08.007
93. Fichorova, R. N., Lee, Y., Yamamoto, H. S., Takagi, Y., Hayes, G. R., Goodman, R. P., Chepa-Lotrea, X., Buck, O. R., Murray, R., Kula, T., Beach, D. H., Singh, B. N., & Nibert, M. L. (2012). Endobiont viruses sensed by the human host - beyond conventional antiparasitic therapy. *PLoS One*, 7(11), e48418. Doi: 10.1371/journal.pone.0048418
94. Fichorova, R. N., Trifonova, R. T., Gilbert, R. O., Costello, C. E., Hayes, G. R., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2006). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infection and Immunity*, 74(10), 5773–5779. Doi: 10.1128/IAI.00631-06
95. Fichorova, R. N., Yamamoto, H. S., Fashemi, T., Foley, E., Ryan, S., Beatty, N., Dawood, H., Hayes, G. R., St-Pierre, G., Sato, S., & Singh, B. N. (2016). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan exploits binding to galectin-1 and -3 to modulate epithelial immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 998–1013. Doi: 10.1074/jbc.M115.651497
96. Forgan, R. (1972). History of the treatment of trichomoniasis. *Sexually Transmitted Infections*, 48(6), 522–524. Doi: 10.1136/sti.48.6.522

97. Fraga, J., Rojas, L., Sarriego, I., Fernández-Calienes, A., & Nuñez, F. A. (2012). Species typing of Cuban *Trichomonas vaginalis* virus by RT-PCR, and association of TVV-2 with high parasite adhesion levels and high pathogenicity in patients. *Archives of Virology*, 157(9), 1789–1795. Doi: 10.1007/s00705-012-1353-4
98. Freeman, W. A., McFadzean, J. A., & Whelan, J. P. (1968). Activity of metronidazole against experimental tetanus and gas gangrene. *The Journal of Applied Bacteriology*, 31(4), 443–447. Doi: 10.1111/j.1365-2672.1968.tb00393.x
99. Friedman, G. D., Jiang, S.-F., Udaltsova, N., Quesenberry, C. P., Jr, Chan, J., & Habel, L. A. (2009). Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *International Journal of Cancer*. 125(9), 2173–2178. Doi: 10.1002/ijc.24545
100. Fu, R., Dou, Z., Li, N., Zhang, J., Li, Z., & Yang, P. (2022). Avenanthramide C induces cellular senescence in colorectal cancer cells via suppressing  $\beta$ -catenin-mediated the transcription of miR-183/96/182 cluster. *Biochemical Pharmacology*, 199, 115021. Doi: 10.1016/j.bcp.2022.115021
101. Fu, W.-Y., Hung, K.-W., Lau, S.-F., Butt, B., Yuen, V. W.-H., Fu, G., Chan, I. C., Ip, F. C. F., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2021). Rhynchophylline administration ameliorates amyloid- $\beta$  pathology and inflammation in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(22), 4249–4256. Doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00600
102. Fung, H. B., & Doan, T.-L. (2005). Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent. *Clinical Therapeutics*, 27(12), 1859–1884. Doi: 10.1016/j.clinthera.2005.12.012
103. Füzi M., & Csukás Z. (1969). Sensitivity of microorganisms of the oral flora to metronidazole. *Orvosi hetilap*, 110(37), 2154–2155.
104. Gabriel, G., Robertson, E., & Thin, R. N. (1982). Single dose treatment of trichomoniasis. *The Journal of International Medical Research*, 10(2), 129–130. Doi: 10.1177/030006058201000212
105. Ganta, K. K., Mandal, A., & Chaubey, B. (2017). Depolarization of mitochondrial membrane potential is the initial event in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz induced cytotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 33(1), 69–82. Doi: 10.1007/s10565-016-9362-9
106. Gao, F. F., Quan, J.-H., Lee, M. A., Ye, W., Yuk, J.-M., Cha, G.-H., Choi, I.-W., & Lee, Y.-H. (2021). *Trichomonas vaginalis* induces apoptosis via ROS and ER stress response through ER-mitochondria crosstalk in SiHa cells. *Parasites & Vectors*, 14(1), 603. Doi: 10.1186/s13071-021-05098-2
107. Garber, G. E., Sibau, L., Ma, R., Proctor, E. M., Shaw, C. E., & Bowie, W. R. (1987). Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(7), 1275–1279. Doi: 10.1128/jcm.25.7.1275-1279.1987
108. Garber, Gary E. (2005). The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 16(1), 35–38. Doi: 10.1155/2005/373920
109. Garcia, A. F., & Alderete, J. (2007). Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, 7, 116. Doi: 10.1186/1471-2180-7-116
110. Garcia, A. F., Chang, T.-H., Benchimol, M., Klumpp, D. J., Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2003). Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*: Surface localization of adhesins by iron and contact. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1207–1224. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03366.x
111. Gaydos, C. A., Hobbs, M., Marrazzo, J., Schwebke, J., Coleman, J. S., Masek, B., Dize, L., Jang, D., Li, J., & Chernesky, M. (2016). Rapid diagnosis of *Trichomonas vaginalis* by testing vaginal swabs in an isothermal helicase-dependent AmpliVue assay. *Sexually Transmitted Diseases*, 43(6), 369–373. Doi: 10.1097/olq.0000000000000447
112. Gaydos, C. A., Klausner, J. D., Pai, N. P., Kelly, H., Coltart, C., & Peeling, R. W. (2017). Rapid and point-of-care tests for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in women and men. *Sexually Transmitted Infections*, 93(S4), S31–S35. Doi: 10.1136/sextrans-2016-053063
113. Geetha, R. G., & Ramachandran, S. (2021). Recent advances in the anti-inflammatory activity of plant-derived alkaloid rhynchophylline in neurological and cardiovascular diseases. *Pharmaceutics*, 13(8), 1170. Doi: 10.3390/pharmaceutics13081170
114. Gendelman, S. R., Pien, L. C., Gutta, R. C., & Abouhassan, S. R. (2014). Modified oral metronidazole desensitization protocol. *Allergy & Rhinology* 5(2), 66–69. Doi: 10.2500/ar.2014.5.0080
115. Gillis, J. C., & Wiseman, L. R. (1996). Secnidazole: A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. *Drugs*, 51(4), 621–638. Doi: 10.2165/00003495-199651040-00007
116. Gonzalez, R. J., & Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*. 15(3), 257–259. Doi: 10.1016/s0887-2333(01)00014-5

117. González-González, A., Sánchez-Sánchez, O., Krauth-Siegel, R. L., Bolognesi, M. L., Gómez-Escobedo, R., Noguera-Torres, B., Vázquez-Jiménez, L. K., Saavedra, E., Encalada, R., Espinoza-Hicks, J. C., Paz-González, A. D., & Rivera, G. (2022). *In Vitro* and *In Silico* Analysis of New n-Butyl and Isobutyl Quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide Derivatives against *Trypanosoma cruzi* as Trypanothione Reductase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13315. Doi: 10.3390/ijms232113315
118. González-Maldonado, P., Alvarenga, N., Burgos-Edwards, A., Flores-Giubi, M. E., Barúa, J. E., Romero-Rodríguez, M. C., Soto-Rifo, R., Valiente-Echeverría, F., Langjahr, P., Cantero-González, G., & Sotelo, P. H. (2022). Screening of natural products inhibitors of SARS-CoV-2 entry. *Molecules* 27(5), 1743. Doi: 10.3390/molecules27051743
119. Gookin, J. L., Hanrahan, K., & Levy, M. G. (2017). The conundrum of feline trichomonosis: the more we learn the 'trickier' it gets. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(3), 261–274. Doi: 10.1177/1098612x17693499
120. Graves, K. J., Ghosh, A. P., Kissinger, P. J., & Muzny, C. A. (2019). *Trichomonas vaginalis* virus: a review of the literature. *International Journal of STD & AIDS*, 30(5), 496–504. Doi: 10.1177/0956462418809767
121. Guenther, P. C., Secor, W. E., & Dezzutti, C. S. (2005). *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and Immunity*, 73(7), 4155–4160. Doi: 10.1128/IAI.73.7.4155-4160.2005
122. Gülmezoglu, A. M., & Forna, F. (2000). Interventions for treating trichomoniasis in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD000218. Doi: 10.1002/14651858.CD000218
123. Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS Journal*, 15(1), 195–218. Doi: 10.1208/s12248-012-9432-8
124. Halgren, T. A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of Computational Chemistry*, 20(7), 730–748. Doi: 10.1002/(sici)1096-987x(199905)20:7<730::aid-jcc8>3.0.co;2-t
125. Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., & Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*: 18(5), 703–710. Doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.012
126. Hammer, J. M., Degroot, A., & Macgregor, J. R. (1954). Atabrin in the treatment of trichomonas infestation in the prostate. *Journal - Michigan State Medical Society*, 53(8), 888–889.
127. Helms, D. J., Mosure, D. J., Metcalf, C. A., Douglas, J. M., Jr, Malotte, C. K., Paul, S. M., & Peterman, T. A. (2008). Risk factors for prevalent and incident *Trichomonas vaginalis* among women attending three sexually transmitted disease clinics. *Sexually Transmitted Diseases*, 35(5), 484–488. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181644b9c
128. Helms, D. J., Mosure, D. J., Secor, W. E., & Workowski, K. A. (2008). Management of trichomonas vaginalis in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(4), 370.e1-7. Doi: 10.1016/j.ajog.2007.10.795
129. Helson, L. (2013). Curcumin (diferuloylmethane) delivery methods: A review. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(1), 21–26. Doi: 10.1002/biof.1080
130. Hezarjaribi, H. Z., Mollarostami, F., Ebrahimnejad, P., Esboei, B. R., Fakhar, M., & Sadeghi-Ghadi, Z. (2022). Promising potent *in vitro* activity of curcumin and quercetin nano-niosomes against *Trichomonas vaginalis*. *Annals of Parasitology*, 68(2), 263–273. Doi: 10.17420/ap6802.432
131. Hobbs, M. M., & Seña, A. C. (2013). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 434–438. Doi: 10.1136/sextrans-2013-051057
132. Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*, 387(10014), 176–187. Doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0
133. Horber, F. F., Maurer, O., Probst, P. J., Heizmann, E., & Frey, F. J. (1989). High haemodialysis clearance of ornidazole in the presence of a negligible renal clearance. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 36(4), 389–393. Doi: 10.1007/bf00558301
134. Horie, H. (1956). Anti-*Trichomonas* effect of azomycin. *The Journal of Antibiotics*, 9(4), 168. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13385191/>
135. Hotez, P. J., & Gurwith, M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. *International Journal of Infectious Diseases*: 15(9), e611-9. Doi: 10.1016/j.ijid.2011.05.006
136. Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Savioli, L., & Takeuchi, T. (2008). A global fund to fight neglected tropical diseases: Is the G8 Hakkaido toyako 2008 summit ready? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(3), e220. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000220

137. Houghton, G. W., Thorne, P. S., Smith, J., Templeton, R., & Collier, J. (1979). Comparison of the pharmacokinetics of metronidazole in healthy female volunteers following either a single oral or intravenous dose. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 8(4), 337–341. Doi: 10.1111/j.1365-2125.1979.tb04715.x
138. Howe, K., & Kissinger, P. J. (2017). Single-dose compared with multidose metronidazole for the treatment of trichomoniasis in women: A meta-analysis. *Sexually Transmitted Diseases*, 44(1), 30–35. Doi: 10.1097/olq.0000000000000537
139. Hrdy, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardonová, L., Foster, P. G., Tachezy, J., & Embley, T. M. (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*, 432(7017), 618–622. Doi: 10.1038/nature03149
140. Huang, K.-Y., Ku, F.-M., Cheng, W.-H., Lee, C.-C., Huang, P.-J., Chu, L. J., Cheng, C.-C., Fang, Y.-K., Wu, H.-H., & Tang, P. (2015). Novel insights into the molecular events linking to cell death induced by tetracycline in the amitochondriate protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6891–6903. Doi: 10.1128/AAC.01779-15
141. Ibáñez-Escribano, A., Fonseca-Berzal, C., Martínez-Montiel, M., Álvarez-Márquez, M., Gómez-Núñez, M., Lacueva-Arnado, M., Espinosa-Buitrago, T., Martín-Pérez, T., Escario, J. A., Merino-Montiel, P., Montiel-Smith, S., Gómez-Barrio, A., López, Ó., & Fernández-Bolaños, J. G. (2022). Thio- and selenosemicarbazones as antiprotozoal agents against *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 781–791. Doi: 10.1080/14756366.2022.2041629
142. Ibáñez-Escribano, A., & Gómez-Barrio, A. (2017). *Trichomonas vaginalis*: The versatility of a tenacious parasite. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 83 (1), 10-47.
143. Ibáñez-Escribano, A., Meneses-Marcel, A., Marrero-Ponce, Y., Nogal-Ruiz, J. J., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A., & Escario, J. A. (2014). A sequential procedure for rapid and accurate identification of putative trichomonacidal agents. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 162–167. Doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.031
144. Ibáñez-Escribano, A., Reviriego, F., Vela, N., Fonseca-Berzal, C., Nogal-Ruiz, J. J., Arán, V. J., Escario, J. A., & Gómez-Barrio, A. (2021). Promising hit compounds against resistant trichomoniasis: Synthesis and antiparasitic activity of 3-( $\omega$ -aminoalkoxy)-1-benzyl-5-nitroindazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 37(127843), 127843. Doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127843
145. Ings, R. M., McFadzean, J. A., & Ormerod, W. E. (1974). The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochemical Pharmacology*, 23(9), 1421–1429. Doi: 10.1016/0006-2952(74)90362-1
146. Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2016). Docking screens for novel ligands conferring new biology: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4103–4120. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b02008
147. Jin, H., Nass, R. D., Joudrey, P. J., Lyon, A. R., Chemaly, E. R., Rapti, K., & Akar, F. G. (2010). Altered spatiotemporal dynamics of the mitochondrial membrane potential in the hypertrophied heart. *Biophysical Journal*, 98(10), 2063–2071. Doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.045
148. Johnson, Gretchen L., & PharmD, B. A. D. (2009). Tinidazole (Tindamax) for Trichomoniasis and Bacterial Vaginosis. 79(2), 102.
149. Johnson, P. J. (1993). Metronidazole and drug resistance. *Parasitology Today*: 9(5), 183–186. Doi: 10.1016/0169-4758(93)90143-4
150. Johnston, V. J., & Mabey, D. C. (2008). Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(1), 56–64. Doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f3d999
151. Juliano, C., Monaco, G., Bandiera, P., Tedde, G., & Cappuccinelli, P. (1987). Action of anticytoskeletal compounds on *in vitro* cytopathic effect, phagocytosis, and adhesiveness of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourinary Medicine*, 63(4), 256–263. Doi: 10.1136/sti.63.4.256
152. Kayamba, F., Faya, M., Poee, O. J., Kushwaha, B., Kushwaha, N. D., Obakachi, V. A., Nyamori, V. O., & Karpoomath, R. (2021). Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: Potential antiparasitic targets for drug development studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 50(116458), 116458. Doi: 10.1016/j.bmc.2021.116458
153. Kedderis, G. L., Argenbright, L. S., & Miwa, G. T. (1989). Covalent interaction of 5-nitroimidazoles with DNA and protein *in vitro*: mechanism of reductive activation. *Chemical Research in Toxicology*, 2(3), 146–149. Doi: 10.1021/tx00009a004
154. Keenan, M., Alexander, P. W., Diao, H., Best, W. M., Khong, A., Kerfoot, M., Thompson, R. C. A., White, L., Shackelford, D. M., Ryan, E., Gregg, A. D., Charman, S. A., von Geldern, T. W., Scandale, I., & Chatelain, E. (2013). Design, structure–activity relationship and *in vivo* efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(7), 1756–1763. Doi: 10.1016/j.bmc.2013.01.050
155. Keri, R. S., Pandule, S. S., Budagumpi, S., & Nagaraja, B. M. (2018). Quinoxaline and quinoxaline-1,4-di-N-oxides: An emerging class of antimycobacterials. *Archives Der Pharmazie*, 351(5). Doi: 10.1002/ardp.201700325

156. Khoshnan, A., & Alderete, J. F. (1994). *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *Journal of Virology*, 68(6), 4035–4038. Doi: 10.1128/JVI.68.6.4035-4038.1994
157. Kingston, M. A., Bansal, D., & Carlin, E. M. (2003). "Shelf life" of *Trichomonas vaginalis*. *International Journal of STD & AIDS*, 14(1), 28–29. Doi: 10.1258/095646203321043228
158. Kissinger, P. (2010). Should expedited partner treatment for women with *Trichomonas vaginalis* be recommended? *Sexually Transmitted Diseases*, 37(6), 397–398. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181dd27ba
159. Kissinger, P., & Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 426–433. Doi: 10.1136/sextrans-2012-051005
160. Kissinger, P., Adamski, A., Clark, R. A., Mena, L., Levison, J., & Martin, D. H. (2013). Does antiretroviral therapy interfere with the treatment of *Trichomonas vaginalis* among HIV+ women? *Sexually Transmitted Diseases*, 40(6), 506–507. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e31829335fe
161. Kissinger, P., Amedee, A., Clark, R. A., Dumestre, J., Theall, K. P., Myers, L., Hagensee, M. E., Farley, T. A., & Martin, D. H. (2009). *Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. *Sexually Transmitted Diseases*, 36(1), 11–16. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e318186defc
162. Kissinger, P. J., Gaydos, C. A., Seña, A. C., Scott McClelland, R., Soper, D., Secor, W. E., Legendre, D., Workowski, K. A., & Muzny, C. A. (2022). Diagnosis and management of *Trichomonas vaginalis*: Summary of evidence reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted infections treatment guidelines. *Clinical Infectious Diseases: 74(Suppl\_2)*, S152–S161. Doi: 10.1093/cid/ciac030
163. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(11), 935–949. Doi: 10.1038/nrd1549
164. Kito, Y., & Suzuki, H. (2003). Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *Journal of Smooth Muscle Research*, 39(5), 163–173. Doi: 10.1540/jsmr.39.163
165. Knowles, S., Choudhury, T., & Shear, N. H. (1994). Metronidazole hypersensitivity. *The Annals of Pharmacotherapy*, 28(3), 325–326. Doi: 10.1177/106002809402800305
166. Koch, A., Bilina, A., Teodorowicz, L., & Sary, A. (1997). *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109(14–15), 584–589.
167. Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), 1893–1904. Doi: 10.1021/ci300604z
168. Kokwaro, G. O., Ismail, S., Glazier, A. P., Ward, S. A., & Edwards, G. (1993). Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on the metabolism of antipyrine and metronidazole in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 45(6), 1243–1249. Doi: 10.1016/0006-2952(93)90276-3
169. Korb, O., Stützel, T., & Exner, T. E. (2009). Empirical scoring functions for advanced Protein–Ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(1), 84–96. Doi: 10.1021/ci800298z
170. Koss, C. A., Baras, D. C., Lane, S. D., Aubry, R., Marcus, M., Markowitz, L. E., & Koumans, E. H. (2012). Investigation of metronidazole use during pregnancy and adverse birth outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4800–4805. Doi: 10.1128/AAC.06477-11
171. Kouznetsov, V. V., Vargas Méndez, L. Y., Tibaduiza, B., Ochoa, C., Montero Pereira, D., Nogal Ruiz, J. J., Fernández Portillo, C., Muelas Serrano, S., Gómez Barrio, A., Bahsas, A., & Amaro-Luis, J. (2004). 4-aryl(benzyl)amino-4-heteroarylbut-1-enes as building blocks in heterocyclic synthesis. 4.1 synthesis of 4, 6-dimethyl-5-nitro(amino)-2-pyridylquinolines and their antiparasitic activities. *Archives Der Pharmazie*, 337(3), 127–132. Doi: 10.1002/ardp.200300783
172. Kramer, F., Halámková, L., Poghossian, A., Schöning, M. J., Katz, E., & Halánek, J. (2013). Biocatalytic analysis of biomarkers for forensic identification of ethnicity between Caucasian and African American groups. *The Analyst*, 138(21), 6251–6257. Doi: 10.1039/c3an01062g
173. Kucknoor, A. S., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2005a). Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infection and Immunity*, 73(10), 6472–6478. Doi: 10.1128/IAI.73.10.6472-6478.2005
174. Kucknoor, A. S., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2005b). Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infection and Immunity*, 73(10), 6472–6478. Doi: 10.1128/IAI.73.10.6472-6478.2005
175. Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2008a). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis*, 44(3), 197–203. Doi: 10.1016/j.micpath.2007.09.004

176. Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2008b). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis*, 44(3), 197–203. Doi: 10.1016/j.micpath.2007.09.004
177. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, 161(2), 269–288. Doi: 10.1016/0022-2836(82)90153-x
178. La Berge, A. F. (1991). Mothers and infants, nurses and nursing: Alfred Donné and the medicalization of child care in nineteenth-century France. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 46(1), 20–43. Doi: 10.1093/jhmas/46.1.20
179. Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V., & Alderete, J. F. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 77(7), 2703–2711. Doi: 10.1128/IAI.00157-09
180. Lamont, R. F., Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., & Romero, R. (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 118(5), 533–549. Doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x
181. Land, K. M., Delgadillo-Correa, M. G., Tachezy, J., Vanacova, S., Hsieh, C. L., Sutak, R., & Johnson, P. J. (2004). Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance: Gene replacement in *Trichomonas*. *Molecular Microbiology*, 51(1), 115–122. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03791.x
182. LaRusso, N. F., Tomasz, M., Kaplan, D., & Müller, M. (1978). Absence of strand breaks in deoxyribonucleic acid treated with metronidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(1), 19–24. Doi: 10.1128/AAC.13.1.19
183. Lavogina, D., Lust, H., Tahk, M.-J., Laasfeld, T., Vellama, H., Nasirova, N., Vardja, M., Eskla, K.-L., Salumets, A., Rinken, A., & Jaal, J. (2022). Revisiting the resazurin-based sensing of cellular viability: Widening the application horizon. *Biosensors*, 12(4), 196. Doi: 10.3390/bios12040196
184. Le Guilloux, V., Schmidtke, P., & Tuffery, P. (2009). Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, 10(1). Doi: 10.1186/1471-2105-10-168
185. Leitsch, D. (2017). Drug susceptibility testing in microaerophilic parasites: Cysteine strongly affects the effectiveness of metronidazole and auranofin, a novel and promising antimicrobial. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 7(3), 321–327. Doi: 10.1016/j.ijpddr.2017.09.001
186. Leitsch, D., Burgess, A. G., Dunn, L. A., Krauer, K. G., Tan, K., Duchêne, M., Upcroft, P., Eckmann, L., & Upcroft, J. A. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1756–1765. Doi: 10.1093/jac/dkr192
187. Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F., & Duchêne, M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular Microbiology*, 72(2), 518–536. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06675.x
188. Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I. B. H., Altmann, F., & Duchêne, M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biology*, 5(8), e211. Doi: 10.1371/journal.pbio.0050211
189. Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., & Duchêne, M. (2012). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 2, 166–170. Doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.04.002
190. Li, Y., Wang, S., Li, H., Song, X., Zhang, H., Duan, Y., Luo, C., Wang, B., Ji, S., Xie, Q., & Zhang, Z. (2020). Development of a convenient detection method for *Trichomonas vaginalis* based on loop-mediated isothermal amplification targeting adhesion protein 65. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). Doi: 10.1186/s12879-020-05048-w
191. Lim, S., Yun, C.-I., Song, D., Kang, S.-S., & Kim, Y.-J. (2022). Validation of avenanthramide and other phenolic compounds in oats and sprouted oats and their antimicrobial properties against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Science and Biotechnology*, 31(9), 1145–1155. Doi: 10.1007/s10068-022-01099-8
192. Lindmark, D. G., & Müller, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10(3), 476–482. Doi: 10.1128/AAC.10.3.476
193. Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today. Technologies*, 1(4), 337–341. Doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007
194. Liston, W. G., & Lees, R. (1940). *Trichomonas vaginalis* infestation in male subjects. *Sexually Transmitted Infections*, 16(1–2), 34–55. Doi: 10.1136/sti.16.1-2.34
195. Liu, E.-Y., Yang, C.-L., Tsai, J.-C., Cheng, H.-Y., & Peng, W.-H. (2023). Antidepressive mechanisms of rhynchophylline in mice with chronic unpredictable stress-induced depression. *Journal of Ethnopharmacology*, 309(116302), 116302. Doi: 10.1016/j.jep.2023.116302

196. Liu, H.-M., & Feng, X.-Z. (1993). Oxindole alkaloids from *Uncaria sinensis*. *Phytochemistry*, 33(3), 707–710. Doi: 10.1016/0031-9422(93)85478-a
197. Llorach-Pares, L., Nonell-Canals, A., Avila, C., & Sanchez-Martinez, M. (2022). Computer-aided drug design (CADD) to DE-orphanize marine molecules: Finding potential therapeutic agents for neurodegenerative and cardiovascular diseases. *Marine Drugs*, 20(1), 53. Doi: 10.3390/md20010053
198. Lloyd, D., & Pedersen, J. Z. (1985). Metronidazole radical anion generation *in vivo* in *Trichomonas vaginalis*: oxygen quenching is enhanced in a drug-resistant strain. *Journal of General Microbiology*, 131(1), 87–92. Doi: 10.1099/00221287-131-1-87
199. Losada Galván, I., Alonso-Padilla, J., Cortés-Serra, N., Alonso-Vega, C., Gascón, J., & Pinazo, M. J. (2021). Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(5), 547–556. Doi: 10.1080/14787210.2021.1834849
200. Ludlum, D. B., Colinas, R. J., Kirk, M. C., & Mehta, J. R. (1988). Reaction of reduced metronidazole with guanosine to form an unstable adduct. *Carcinogenesis*, 9(4), 593–596. Doi: 10.1093/carcin/9.4.593
201. Lustig, G., Ryan, C. M., Secor, W. E., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 81(5), 1411–1419. Doi: 10.1128/IAI.01244-12
202. Ma, B., Wu, C.-F., Yang, J.-Y., Wang, R., Kano, Y., & Yuan, D. (2009). Three New Alkaloids from the Leaves of *Uncaria rhynchophylla*. *Helvetica Chimica Acta*, 92(8), 1575–1585. Doi: 10.1002/hlca.200900021
203. Ma, Z. S., & Li, L. (2017). Quantifying the human vaginal community state types (CSTs) with the species specificity index. *PeerJ*, 5(e3366), e3366. Doi: 10.7717/peerj.3366
204. Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., McKee, K. T., Jr, & Gaydos, C. A. (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3205–3210. Doi: 10.1128/JCM.36.11.3205-3210.1998
205. Maeda, K., Osato, T., & Umezawa, H. (1953). A new antibiotic, azomycin. *The Journal of Antibiotics*, 6(4), 182.
206. Mahajan, G., Doherty, E., To, T., Sutherland, A., Grant, J., Junaid, A., Gulati, A., LoGrande, N., Izadifar, Z., Timilsina, S. S., Horváth, V., Plebani, R., France, M., Hood-Pishchany, I., Rakoff-Nahoum, S., Kwon, D. S., Goyal, G., Prantil-Baun, R., Ravel, J., & Ingber, D. E. (2022). Vaginal microbiome- host interactions modeled in a human vagina-on-a-chip. *Microbiome*, 10(1), 201. Doi: 10.1186/s40168-022-01400-1
207. Malli, S., Loiseau, P. M., & Bouchemal, K. (2020). *Trichomonas vaginalis* motility is blocked by drug-free Thermosensitive hydrogel. *ACS Infectious Diseases*, 6(1), 114–123. Doi: 10.1021/acsinfectdis.9b00243
208. Mallo, N., Lamas, J., & Leiro, J. M. (2013). Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2476–2484. Doi: 10.1128/AAC.00009-13
209. Mann, J. R., McDermott, S., Barnes, T. L., Hardin, J., Bao, H., & Zhou, L. (2009). Trichomoniasis in pregnancy and mental retardation in children. *Annals of Epidemiology*, 19(12), 891–899. Doi: 10.1016/j.annepidem.2009.08.004
210. Manny, A. R., Hetzel, C. A., Mizani, A., & Nibert, M. L. (2022). Discovery of a novel species of *trichomonasvirus* in the human parasite *Trichomonas vaginalis* using transcriptome mining. *Viruses*, 14(3), 548. Doi: 10.3390/v14030548
211. Marcondes, N. A., Terra, S. R., Lasta, C. S., Hlavac, N. R. C., Dalmolin, M. L., Lacerda, L. de A., Faulhaber, G. A. M., & González, F. H. D. (2019). Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: A flow cytometry study: Mitochondrial Viability in Stored Platelets. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 95(2), 214–218. Doi: 10.1002/cyto.a.23567
212. Marcou, G., & Rognan, D. (2007). Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(1), 195–207. Doi: 10.1021/ci600342e
213. Margarita, V., Congiargiu, A., Diaz, N., Fiori, P. L., & Rappelli, P. (2023). *Mycoplasma hominis* and *Candidatus Mycoplasma girerdii* in *Trichomonas vaginalis*: Peaceful Cohabitants or Contentious Roommates? *Pathogens*, 12(9), 1083. Doi: 10.3390/pathogens12091083
214. Margarita, V., Rappelli, P., Dessi, D., Pintus, G., Hirt, R. P., & Fiori, P. L. (2016). Symbiotic association with *Mycoplasma hominis* can influence growth rate, ATP production, cytolysis and inflammatory response of *Trichomonas vaginalis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 953. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00953
215. Marques-Silva, M., Lisboa, C., Gomes, N., & Rodrigues, A. G. (2021). *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: a systematic review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 35(10), 2007–2021. Doi: 10.1111/jdv.17461
216. Martín, R., & Suárez, J. E. (2010). Biosynthesis and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 400–405. Doi: 10.1128/AEM.01631-09

217. Martínez-Grueiro, M. M., Montero-Pereira, D., Giménez-Pardo, C., Nogal-Ruiz, J. J., Escario, J. A., & Gómez-Barrio, A. (2003). *Trichomonas vaginalis*: determination of acid phosphatase activity as a pharmacological screening procedure. *The Journal of Parasitology*, 89(5), 1076–1077. Doi: 10.1645/GE-3129RN
218. Masha, S. C., Cools, P., Sanders, E. J., Vaneechoutte, M., & Crucitti, T. (2019). *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. *Sexually Transmitted Infections*, 95(1), 36–42. Doi: 10.1136/sextrans-2018-053713
219. Mason, R. P., & Holtzman, J. L. (1975). The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67(4), 1267–1274. Doi: 10.1016/0006-291x(75)90163-1
220. Masters, L., Eagon, S., & Heying, M. (2020). Evaluation of consensus scoring methods for AutoDock Vina, smina and idock. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 96(107532), 107532. Doi: 10.1016/j.jmgm.2020.107532
221. McGregor, J. A., French, J. I., & Seo, K. (1991). Adjunctive clindamycin therapy for preterm labor: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165 867–875. Doi: 10.1016/0002-9378(91)90430-y
222. McIlwain, H. (1943). 88. Bacterial inhibition by metabolite analogues. Part V. Reactions and antibacterial properties of p-diazine di-N-oxides. *Journal of the Chemical Society*, 0, 322. Doi: 10.1039/jr9430000322
223. Mercer, F., Diala, F. G. I., Chen, Y.-P., Molgora, B. M., Ng, S. H., & Johnson, P. J. (2016). Leukocyte lysis and cytokine induction by the human sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004913. Doi: 10.1371/journal.pntd.0004913
224. Midlej, V., & Benchimol, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology*, 137(1), 65–76. Doi: 10.1017/S0031182009991041
225. Miller, M. R., & Nyirjesy, P. (2011). Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. *Current Infectious Disease Reports*, 13(6), 595–603. Doi: 10.1007/s11908-011-0213-9
226. Miller, W. C., Swygard, H., Hobbs, M. M., Ford, C. A., Handcock, M. S., Morris, M., Schmitz, J. L., Cohen, M. S., Harris, K. M., & Udry, J. R. (2005). The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, 32(10), 593–598. Doi: 10.1097/01.olq.0000179874.76360.ad
227. Miller, W. C., & Zenilman, J. M. (2005). Epidemiology of chlamydial infection, gonorrhea, and trichomoniasis in the United States--2005. *Infectious Disease Clinics of North America*, 19(2), 281–296. Doi: 10.1016/j.idc.2005.04.001
228. Miranda-Ozuna, J. F. T., Hernández-García, M. S., Briebe, L. G., Benítez-Cardoza, C. G., Ortega-López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2016). The glycolytic enzyme Triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity*, 84(10), 2878–2894. Doi: 10.1128/iai.00538-16
229. Miyamoto, Y., Kalisiak, J., Korthals, K., Lauwaet, T., Cheung, D. Y., Lozano, R., Cobo, E. R., Upcroft, P., Upcroft, J. A., Berg, D. E., Gillin, F. D., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., & Eckmann, L. (2013). Expanded therapeutic potential in activity space of next-generation 5-nitroimidazole antimicrobials with broad structural diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17564–17569. Doi: 10.1073/pnas.1302664110
230. Mo, C., Yamagata, R., Pan, A., Reddy, J., Hazari, N., & Duke, G. (2008). Development of a high-throughput Alamar blue assay for the determination of influenza virus infectious dose, serum antiviral neutralization titer and virus ca/ts phenotype. *Journal of Virological Methods*, 150(1–2), 63–69. Doi: 10.1016/j.jviromet.2008.03.006
231. Moodley, P., Wilkinson, D., Connolly, C., Moodley, J., & Sturm, A. W. (2002). *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(4), 519–522. Doi: 10.1086/338399
232. Moore, G. E., & Hood, D. B. (1993). Modified RPMI 1640 culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 29A(4), 268. Doi: 10.1007/bf02633952
233. Moore, G. E., Murphy, G. P., Papermaster, B. W., Amiraian, K., Kenny, G. M., & Moore, R. H. (1969). Purified roswell park cultured antilymphocyte globulin RPMI-CALG: Preparation and clinical trial. *Journal of Surgical Oncology*, 1(2), 153–166. Doi: 10.1002/jso.2930010208
234. Morada, M., Manzur, M., Lam, B., Tan, C., Tachezy, J., Rappelli, P., Dessi, D., Fiori, P. L., & Yarlett, N. (2010). Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 12), 3734–3743. Doi: 10.1099/mic.0.042192-0
235. Moreno, S. N., Mason, R. P., & Docampo, R. (1984). Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Trichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(13), 8252–8259. Doi: 10.1016/s0021-9258(17)39721-1
236. Moreno, S. N., Mason, R. P., Muniz, R. P., Cruz, F. S., & Docampo, R. (1983). Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(7), 4051–4054. Doi: 10.1016/s0021-9258(18)32579-1

237. Moreno-Brito, V., Yáñez-Gómez, C., Meza-Cervantez, P., Avila-González, L., Rodríguez, M. A., Ortega- López, J., González-Robles, A., & Arroyo, R. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron: *T. vaginalis* novel adhesin, AP120, has homology to hydrogenosomal PFO. *Cellular Microbiology*, 7(2), 245–258. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00455.x
238. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. Doi: 10.1002/jcc.21256
239. Moskovitz, J., Yim, M. B., & Chock, P. B. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2), 354–359. Doi: 10.1006/abbi.2001.2692
240. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. Doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
241. Mtshali, A., Ngcapu, S., Govender, K., Sturm, A. W., Moodley, P., & Joubert, B. C. (2022). In vitro effect of 5-nitroimidazole drugs against *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0091222. Doi: 10.1128/spectrum.00912-22
242. Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 2879–2889. Doi: 10.1099/00221287-139-12-2879
243. Müller, M., & Gorrell, T. E. (1983). Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24(5), 667–673. Doi: 10.1128/AAC.24.5.667
244. Muñoz, C., Pérez, M., Orrego, P. R., Osorio, L., Gutiérrez, B., Sagua, H., Castillo, J. L., Martínez-Oyanedel, J., Arroyo, R., Meza-Cervantez, P., da Silveira, J. F., Midlej, V., Benchimol, M., Cordero, E., Morales, P., Araya, J. E., & González, J. (2012). A protein phosphatase 1 gamma (PP1 $\gamma$ ) of the human protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* is involved in proliferation and cell attachment to the host cell. *International Journal for Parasitology*, 42(8), 715–727. Doi: 10.1016/j.ijpara.2012.03.012
245. Muzny, C. A., Van Gerwen, O. T., Kaufman, G., & Chavoustie, S. (2023). Efficacy of single-dose oral secnidazole for the treatment of trichomoniasis in women co-infected with trichomoniasis and bacterial vaginosis: a post hoc subgroup analysis of phase 3 clinical trial data. *BMJ open*, 13(8). Doi: 10.1136/bmjopen-2023-072071
246. Muzny, C. A., Rivers, C. A., Mena, L. A., & Schwebke, J. R. (2012). Genotypic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates among women who have sex with women in sexual partnerships. *Sexually Transmitted Diseases*, 39(7), 556–558. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e31824f1c49
247. Muzny, C. A., & Schwebke, J. R. (2013). The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 423–425. Doi: 10.1136/sextrans-2012-050893
248. Muzny, C., Barnes, A., & Mena, L. (2012). Symptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in the setting of severe nitroimidazole allergy: successful treatment with boric acid. *Sexual Health*, 9(4), 389–391. Doi: 10.1071/SH11114
249. Nailor, M. D., & Sobel, J. D. (2007). Tinidazole for the treatment of vaginal infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(5), 743–751. Doi: 10.1517/13543784.16.5.743
250. Najafi, A., Chaechi Nosrati, M. R., Ghasemi, E., Navi, Z., Yousefi, A., Majidani, H., Ghaneialvar, H., Sayehmiri, K., Galvan-Ramirez, M. D. la L., & Fakhar, M. (2019). Is there association between *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer risk?: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 137(103752), 103752. Doi: 10.1016/j.micpath.2019.103752
251. Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2021). Trogocytosis in unicellular eukaryotes. *Cells* 10(11), 2975. Doi: 10.3390/cells10112975
252. Nakamura, S. (1955). Structure of Azomycin, a new antibiotic. *Pharmaceutical Bulletin*, 3(5), 379–383. Doi: 10.1248/cpb1953.3.379
253. Narcisi, E. M., & Secor, W. E. (1996). In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(5), 1121–1125. Doi: 10.1128/AAC.40.5.1121
254. Narikawa, S. (1986). Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18(5), 565–574. Doi: 10.1093/jac/18.5.565
255. Nastro, L. J., & Finegold, S. M. (1972). Bactericidal activity of five antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 126(1), 104–107. Doi: 10.1093/infdis/126.1.104
256. Nathan, C., & Cunningham-Bussell, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 349–361. Doi: 10.1038/nri3423
257. Natto, M. J., Savioli, F., Quashie, N. B., Dardonville, C., Rodenko, B., & de Koning, H. P. (2012). Validation of novel fluorescence assays for the routine screening of drug susceptibilities of *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 933–943. Doi: 10.1093/jac/dkr572

258. Nicol, C. S., Barrow, J., & Redmond, A. (1960). Flagyl (8823 RP) in the treatment of trichomoniasis. *The British Journal of Venereal Diseases*, 36(3), 152–153. Doi: 10.1136/sti.36.3.152
259. Nie, L., Wise, M. L., Peterson, D. M., & Meydani, M. (2006). Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186(2), 260–266. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.027
260. Nieminen, J., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Poirier, F., & Sato, S. (2008). Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2466–2473. Doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2466
261. Nogueira, C. W., Barbosa, N. V., & Rocha, J. B. T. (2021). Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. *Archives of Toxicology*, 95(4), 1179–1226. Doi: 10.1007/s00204-021-03003-5
262. Nyirjesy, P., Sobel, J. D., Weitz, M. V., Leaman, D. J., & Gelone, S. P. (1998). Difficult-to-treat trichomoniasis: results with paromomycin cream. *Clinical Infectious Diseases*: 26(4), 986–988. Doi: 10.1086/513951
263. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1). Doi: 10.1186/1758-2946-3-33
264. O'Brien, J. L., Lauriano, C. M., & Alderete, J. F. (1996). Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis*, 20(6), 335–349. Doi: 10.1006/mpat.1996.0032
265. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity: Resazurin as a cytotoxicity assay. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. Doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
266. Okumura, C. Y. M., Baum, L. G., & Johnson, P. J. (2008). Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cellular Microbiology*, 10(10), 2078–2090. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01190.x
267. Oliveira, A. P. A., Ferreira, I. P., Despaigne, A. A. R., Silva, J. G. da, Vieira, A. C. S., Santos, M. S., Alexandre-Moreira, M. S., Diniz, R., & Beraldo, H. (2019). Structural studies and antileishmanial activity of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine nitroimidazole-derived hydrazones. *Acta Crystallographica. Section C, Structural Chemistry*, 75(3), 320–328. Doi: 10.1107/s2053229619001529
268. Oliveira, H. C. F., & Vercesi, A. E. (2020). Mitochondrial bioenergetics and redox dysfunctions in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 71, 100840. Doi: 10.1016/j.mam.2019.100840
269. Ong, S.-C., Cheng, W.-H., Ku, F.-M., Tsai, C.-Y., Huang, P.-J., Lee, C.-C., Yeh, Y.-M., Rada, P., Hrdý, I., Narayanasamy, R. K., Smutná, T., Lin, R., Luo, H.-W., Chiu, C.-H., Tachezy, J., & Tang, P. (2022). Identification of endosymbiotic virus in small extracellular vesicles derived from *Trichomonas vaginalis*. *Genes*, 13(3), 531. Doi: 10.3390/genes13030531
270. Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L. M. P. E., Szczepanowska, J., Koopman, W. J. H., & Wieckowski, M. R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods* 109, 3–11. Doi: 10.1016/j.ymeth.2016.06.008
271. Paget, T. A., & Lloyd, D. (1990). *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41(1), 65–72. Doi: 10.1016/0166-6851(90)90097-6
272. Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K., & Samuelson, J. (2009). *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 458–464. Doi: 10.1128/AAC.00909-08
273. Palos, I., Moo-Puc, R., Vique-Sánchez, J. L., Benítez-Cardoza, C. G., Monge, A., Villalobos-Rocha, J. C., Paz-Gonzalez, A. D., & Rivera, G. (2021). Esters of quinoxaline-7-carboxylate-1,4-di-N-oxide as *Trichomonas vaginalis* triosephosphate isomerase inhibitors. *Acta Pharmaceutica*, 71(3), 485–495. Doi: 10.2478/acph-2021-0032
274. Pantsar, T., & Poso, A. (2018). Binding affinity via docking: Fact and fiction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8), 1899. Doi: 10.3390/molecules23081899
275. Papoutsis, A., & Kokkinidis, G. (1994). Electrocatalytic reduction of nitro compounds on gold UPD modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry (Lausanne, Switzerland)*, 371(1–2), 231–239. Doi: 10.1016/0022-0728(93)03232-e
276. Patel, E. U., Gaydos, C. A., Packman, Z. R., Quinn, T. C., & Tobian, A. A. R. (2018). Prevalence and correlates of *Trichomonas vaginalis* infection among men and women in the United States. *Clinical Infectious Diseases*: 67(2), 211–217. Doi: 10.1093/cid/ciy079
277. Patil, M. J., Nagamoti, J. M., & Metgud, S. C. (2012). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet mount microscopy, In Pouch TV culture system, and PCR. *Journal of Global Infectious Diseases*, 4(1), 22–25. Doi: 10.4103/0974-777X.93756

278. Patterson, S., & Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30(6), 289–298. Doi: 10.1016/j.pt.2014.04.003
279. Pattman, R. S., Sprott, M. S., Kearns, A. M., & Earnshaw, M. (1989). Failure of mebendazole to cure *trichomonal vaginitis* resistant to metronidazole: case reports. *Genitourinary Medicine*, 65(4), 274–275. Doi: 10.1136/sti.65.4.274
280. Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C., & Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in trichomonads--new insights. *Protist*, 154(3–4), 313–329. Doi: 10.1078/143446103322454095
281. Peterman, T. A., Tian, L. H., Metcalf, C. A., Malotte, C. K., Paul, S. M., Douglas, J. M., Jr, & RESPECT- 2 Study Group. (2009). Persistent, undetected *Trichomonas vaginalis* infections? *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(2), 259–260. Doi: 10.1086/595706
282. Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 300–317. Doi: 10.1128/cmr.11.2.300
283. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. Doi: 10.1002/jcc.20084
284. Pinheiro, A., C. Mendonça Nogueira, T., & V. N. de Souza, M. (2016). Quinoxaline nucleus: A promising scaffold in anti-cancer drug discovery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(10), 1339–1352. Doi: 10.2174/1871520616666160622090839
285. Plant, C. W., & Edwards, D. I. (1976). Effect of tinidazole, metronidazole and nitrofurazone on nucleic acid synthesis in *Clostridium bifermentans*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), 203–209. Doi: 10.1093/jac/2.2.203
286. Pogodin, P. V., Lagunin, A. A., Filimonov, D. A., & Poroikov, V. V. (2015). PASS Targets: Ligand-based multi-target computational system based on a public data and naïve Bayes approach. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 26(10), 783–793. Doi: 10.1080/1062936X.2015.1078407
287. Poppe, W. A. (2001). Nitroimidazole-resistant vaginal trichomoniasis treated with paromomycin. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 96(1), 119–120. Doi: 10.1016/s0301-2115(00)00403-6
288. Powell, S. J., MacLeod, I., Wilmot, A. J., & Elsdon-Dew, R. (1966). Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. *Lancet*, 2(7477), 1329–1331. Doi: 10.1016/s0140-6736(66)92081-2
289. Qin, N., Lu, X., Liu, Y., Qiao, Y., Qu, W., Feng, F., & Sun, H. (2021). Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210 112960. Doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112960
290. Qu, B., Li, Q. T., Wong, K. P., Tan, T. M., & Halliwell, B. (2001). Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(5), 659–669. Doi: 10.1016/s0891-5849(01)00632-3
291. Qu, J., Gong, T., Ma, B., Zhang, L., Kano, Y., & Yuan, D. (2012). Comparative study of fourteen alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* hooks and leaves using HPLC-diode array detection-atmospheric pressure chemical ionization/MS method. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 23–30. Doi: 10.1248/cpb.60.23
292. Quon, D. V., d'Oliveira, C. E., & Johnson, P. J. (1992). Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4402–4406. Doi: 10.1073/pnas.89.10.4402
293. Rabinovich, G. A., & Gruppi, A. (2005). Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunology*, 27(4), 103–114. Doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00749.x
294. Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347–12360. Doi: 10.3390/s120912347
295. Rasoloson, D., Tomková, E., Cammack, R., Kulda, J., & Tachezy, J. (2001). Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology*, 123, 45–56. Doi: 10.1017/s0031182001008022
296. Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4680–4687. Doi: 10.1073/pnas.1002611107
297. Ravindranath, P. A., Forli, S., Goodsell, D. S., Olson, A. J., & Sanner, M. F. (2015). AutoDockFR: Advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. *PLoS Computational Biology*, 11(12), e1004586. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1004586
298. Reis, F. P. dos, Rigo, G. V., Nogueira, C. W., Tasca, T., Sari, M. H. M., & Cruz, L. (2022). Locust bean gum nano-based hydrogel for vaginal delivery of diphenyl diselenide in the treatment of trichomoniasis: Formulation characterization and in vitro biological evaluation. *Pharmaceutics*, 14(10), 2112. Doi: 10.3390/pharmaceutics14102112

299. Rivera, G. (2022). Quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives: Are they unselective or selective inhibitors? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(1), 15–25. Doi: 10.2174/1389557521666210126142541
300. Rocha, D. A. S., de Andrade Rosa, I., de Souza, W., & Benchimol, M. (2014). Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 113(3), 1041–1047. Doi: 10.1007/s00436-013-3738-z
301. Rodin, P., King, A. J., Nicol, C. S., & Barrow, J. (1960). Flagyl in the treatment of trichomoniasis. *Sexually Transmitted Infections*, 36(3), 147–151. Doi: 10.1136/sti.36.3.147
302. Roffia, S., Gottardi, C., & Vianello, E. (1982). Electrochemical behaviour of 4-nitroimidazole and 2-methyl-5-nitroimidazole. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 142(1–2), 263–275. Doi: 10.1016/s0022-0728(82)80020-x
303. Rogers, S. M., Turner, C. F., Hobbs, M., Miller, W. C., Tan, S., Roman, A. M., Eggleston, E., Villarroel, M. A., Ganapathi, L., Chromy, J. R., & Erbeling, E. (2014). Epidemiology of undiagnosed trichomoniasis in a probability sample of urban young adults. *PLoS One*, 9(3), e90548. Doi: 10.1371/journal.pone.0090548
304. Ryan, C. M., de Miguel, N., & Johnson, P. J. (2011). *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interactions. *Essays in Biochemistry*, 51, 161–175. Doi: 10.1042/bse0510161
305. Ryu, J. S., Choi, H. K., Min, D. Y., Ha, S. E., & Ahn, M. H. (2001). Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Parasitology*, 87(2), 457–460. Doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0457:EOIOTV]2.0.CO;2
306. Ryu, J.-S., Kang, J.-H., Jung, S.-Y., Shin, M.-H., Kim, J.-M., Park, H., & Min, D.-Y. (2004). Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 72(3), 1326–1332. Doi: 10.1128/IAI.72.3.1326-1332.2004
307. Sariego, I., Monzote, L., & Rojas, L. (2014). Setting a colorimetric assay with MTT for assessment of trichomonocidal activity. *Current Clinical Pharmacology*, 9(3), 283–287. Doi: 10.2174/157488470903140806120218
308. Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–324. Doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.006
309. Schadich, E., Nylén, S., Gurská, S., Kotulová, J., Andronati, S., Pavlovsky, V., Soboleva, S., Polishchuk, P., Hajdúch, M., & Džubák, P. (2022). Activity of 1-aryl-4-(naphthalimidoalkyl) piperazine derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania mexicana*. *Parasitology International*, 9, 102647. Doi: 10.1016/j.parint.2022.102647
310. Schmid, A., & Schmid, H. (1999). Pharmacotoxicological mode of action of antimicrobial 5-nitroimidazole derivatives. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe A*, 46(9), 517–522. Doi: 10.1046/j.1439-0442.1999.00245.x
311. Schneider, J. (1961). Treatment of giardiasis (lambliasis) by metronidazole. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 54, 84–95.
312. Schwartz, D. E., & Jeunet, F. (1976). Comparative pharmacokinetic studies of ornidazole and metronidazole in man. *Chemotherapy*, 22(1), 19–29. Doi: 10.1159/000221906
313. Schwebke, J. R., & Barrientes, F. J. (2006). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4209–4210. Doi: 10.1128/aac.00814-06
314. Schwebke, J. R., & Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 794–803, table of contents. Doi: 10.1128/CMR.17.4.794-803.2004
315. Schwebke, J. R., Hobbs, M. M., Taylor, S. N., Sena, A. C., Catania, M. G., Weinbaum, B. S., Johnson, A. D., Getman, D. K., & Gaydos, C. A. (2011). Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a prospective U.S. clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4106–4111. Doi: 10.1128/JCM.01291-11
316. Seña, A. C., Bachmann, L. H., & Hobbs, M. M. (2014). Persistent and recurrent *Trichomonas vaginalis* infections: epidemiology, treatment and management considerations. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(6), 673–685. Doi: 10.1586/14787210.2014.887440
317. Seña, A. C., Miller, W. C., Hobbs, M. M., Schwebke, J. R., Leone, P. A., Swygard, H., Atashili, J., & Cohen, M. S. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(1), 13–22. Doi: 10.1086/511144
318. Shadel, G. S., & Horvath, T. L. (2015). Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 163(3), 560–569. Doi: 10.1016/j.cell.2015.10.001
319. Shafir, S. C., Sorvillo, F. J., & Smith, L. (2009). Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 37–45. Doi: 10.1128/CMR.00002-08

320. Sherrard, J., Ison, C., Moody, J., Wainwright, E., Wilson, J., & Sullivan, A. (2014). United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis* 2014. *International Journal of STD & AIDS*, 25(8), 541–549. Doi: 10.1177/0956462414525947
321. Shiflett, A. M., & Johnson, P. J. (2010). Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 409–429. Doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162826
322. Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862–865. Doi: 10.1038/nature03197
323. Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., & Irwin, J. J. (2002). Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(4), 439–446. Doi: 10.1016/s1367-5931(02)00339-3
324. Silva, L., Coelho, P., Soares, R., Prudêncio, C., & Vieira, M. (2019). Quinoxaline-1,4-dioxide derivatives inhibitory action in melanoma and brain tumor cells. *Future Medicinal Chemistry*, 11(7), 645–657. Doi: 10.4155/fmc-2018-0251
325. Silver, B. J., Guy, R. J., Kaldor, J. M., Jamil, M. S., & Rumbold, A. R. (2014). *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: A systematic review and meta-analysis. *Sexually Transmitted Diseases*, 41(6), 369–376. Doi: 10.1097/olq.0000000000000134
326. Simpson, P., Higgins, G., Qiao, M., Waddell, R., & Kok, T. (2007). Real-time PCRs for detection of *Trichomonas vaginalis* beta-tubulin and 18S rRNA genes in female genital specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 6), 772–777. Doi: 10.1099/jmm.0.47163-0
327. Singh, B. N., Hayes, G. R., Lucas, J. J., Sommer, U., Viseux, N., Mirgorodskaya, E., Trifonova, R. T., Sassi, R. R. S., Costello, C. E., & Fichorova, R. N. (2009). Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconjugate Journal*, 26(1), 3–17. Doi: 10.1007/s10719-008-9157-1
328. Singh, S., Singh, G., Sagar, N., Yadav, P. K., Jain, P. A., Gautam, B., & Wadhwa, G. (2012). Insight into *Trichomonas vaginalis* genome evolution through metabolic pathways comparison. *Bioinformation*, 8(4), 189–195. Doi: 10.6026/97320630008189
329. Śledź, P., & Caffisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93–102. Doi: 10.1016/j.sbi.2017.10.010
330. Smith, M. A., & Edwards, D. I. (1995). The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(3), 453–461. Doi: 10.1093/jac/36.3.453
331. Sobel, J. D., Nyirjesy, P., & Brown, W. (2001). Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1341–1346. Doi: 10.1086/323034
332. Soliman, D. H. (2013). Synthesis, characterization, anti-bacterial and anti-fungal activities of new quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives. *International Journal of Organic Chemistry*, 03(03), 65–72. Doi: 10.4236/ijoc.2013.33a007
333. Song, H.-O., Shin, M.-H., Ahn, M.-H., Min, D.-Y., Kim, Y.-S., & Ryu, J.-S. (2008). *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. *Experimental Parasitology*, 118(1), 59–65. Doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.010
334. Soper, D. (2004). Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(1), 281–290. Doi: 10.1016/j.ajog.2003.08.023
335. Soto-Sánchez, J., Caro-Gómez, L. A., Paz-González, A. D., Marchat, L. A., Rivera, G., Moo-Puc, R., Arias, D. G., & Ramírez-Moreno, E. (2020). Biological activity of esters of quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide against *E. histolytica* and their analysis as potential thioredoxin reductase inhibitors. *Parasitology Research*, 119(2), 695–711. Doi: 10.1007/s00436-019-06580-8
336. Stanaway, D., Haggerty, R., Benner, S., Flores, A., & Feris, K. (2012). Persistent metal contamination limits lotic ecosystem heterotrophic metabolism after more than 100 years of exposure: a novel application of the Resazurin Resorufin Smart Tracer. *Environmental Science & Technology*, 46(18), 9862–9871. Doi: 10.1021/es3015666
337. Steindel, P. A., Chen, E. H., Wirth, J. D., & Theobald, D. L. (2016). Gradual neofunctionalization in the convergent evolution of trichomonad lactate and malate dehydrogenases: Gradual Neofunctionalization of Trichomonad Lactate Dehydrogenase. *Protein Science*: 25(7), 1319–1331. Doi: 10.1002/pro.2904
338. Sun, Y., Sun, X., Zhao, L., Zhang, Z., Wang, Y., Dai, Z., Zhao, X., & Pu, X. (2020). DJ-1 deficiency causes metabolic abnormality in ornidazole-induced asthenozoospermia. *Reproduction*, 160(6), 931–941. Doi: 10.1530/REP-20-0097
339. Suter, W., Rosselet, A., & Knüsel, F. (1978). Mode of action of quinoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxides on *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(5), 770–783. Doi: 10.1128/aac.13.5.770
340. Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E. H., McQuillan, G., Berman, S., & Markowitz, L. (2007). The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. *Clinical Infectious Diseases*, 45(10), 1319–1326. Doi: 10.1086/522532

341. Tachezy, J., Sánchez, L. B., & Müller, M. (2001). Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Molecular Biology and Evolution*, 18(10), 1919–1928. Doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003732
342. Tadele, M., Abay, S. M., Asaga, P., Makonnen, E., & Hailu, A. (2021). *In vitro* growth inhibitory activity of Medicines for Malaria Venture pathogen box compounds against *Leishmania aethiopica*. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22(1), 71. Doi: 10.1186/s40360-021-00538-2
343. Tang, R., Liang, J., Li, Y., Wu, T., Zhang, Y., Ma, Y., & Liu, X. (2021). Ornidazole-induced recurrent encephalopathy in a Chinese man: A rare case report and literature review. *Frontiers in Neurology*, 12, 706094. Doi: 10.3389/fneur.2021.706094
344. Tejman-Yarden, N., Millman, M., Lauwaet, T., Davids, B. J., Gillin, F. D., Dunn, L., Upcroft, J. A., Miyamoto, Y., & Eckmann, L. (2011). Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4643–4651. Doi: 10.1128/AAC.00384-11
345. Teodoro, J. S., Nunes, S., Rolo, A. P., Reis, F., & Palmeira, C. M. (2018). Therapeutic options targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation to hinder the progression of vascular complications of diabetes. *Frontiers in Physiology*, 9, 1857. Doi: 10.3389/fphys.2018.01857
346. Thorburn, A. L. (1974). Alfred François Donné, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia. *The British Journal of Venereal Diseases*, 50(5), 377–380. Doi: 10.1136/sti.50.5.377
347. Thurman, A. R., & Doncel, G. F. (2011). Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition: Vaginal infections and HIV susceptibility. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65(2), 89–98. Doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00902.x
348. Tobin, W. (2006). Alfred Donné and Léon Foucault: The first applications of electricity and photography to medical illustration. *Journal of Visual Communication in Medicine*, 29(1), 6–13. Doi: 10.1080/01405110600575993
349. Toolabi, A., Malakootian, M., Ghaneian, M. T., Esrafil, A., Ehrampoush, M. H., Tabatabaei, M., & AskarShahi, M. (2017). Optimization of photochemical decomposition acetamiprid pesticide from aqueous solutions and effluent toxicity assessment by *Pseudomonas aeruginosa* BCRC using response surface methodology. *AMB Express*, 7(1), 159. Doi: 10.1186/s13568-017-0455-5
350. Torres, E., Moreno-Viguri, E., Galiano, S., Devarapally, G., Crawford, P. W., Azqueta, A., Arbillaga, L., Varela, J., Birriel, E., Di Maio, R., Cerecetto, H., González, M., Aldana, I., Monge, A., & Pérez-Silanes, S. (2013). Novel quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as new potential antichagasic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 324–334. Doi: 10.1016/j.ejmech.2013.04.065
351. Totrov, M., & Abagyan, R. (2008). Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), 178–184. Doi: 10.1016/j.sbi.2008.01.004
352. Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2). Doi: 10.1002/jcc.21334
353. Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003482. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003482
354. Unlu, A., Nayir, E., Dogukan, K. M., Kirca, O., & Ozdogan, M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(5).
355. Upcroft, P., & Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 150–164. Doi: 10.1128/CMR.14.1.150-164.2001
356. van de Wijgert, J. H. H. M., Borgdorff, H., Verhelst, R., Crucitti, T., Francis, S., Verstraelen, H., & Jaspers, V. (2014). The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One*, 9(8), e105998. Doi: 10.1371/journal.pone.0105998
357. Van der Pol, B. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(1), 23–25. Doi: 10.1086/509934
358. Van Gerwen, O. T., Craig-Kuhn, M. C., Jones, A. T., Schroeder, J. A., Deaver, J., Buekens, P., Kissinger, P. J., & Muzny, C. A. (2021). Trichomoniasis and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 128(12), 1907–1915. Doi: 10.1111/1471-0528.16774
359. Vancini, R. G., & Benchimol, M. (2008). Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Microbiology*, 189(1), 7–18. Doi: 10.1007/s00203-007-0288-8
360. Vargas Rigo, G., Willig, J. B., Devereux, M., McCann, M., Souza dos Santos, A. L., & Tasca, T. (2023). Oxidative damage by 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver and copper complexes lead to apoptotic-like death in *Trichomonas vaginalis*. *Research in Microbiology*, 174(4), 104015. Doi: 10.1016/j.resmic.2022.104015

361. Vasta, G. R. (2012). Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 946, 21–36. Doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3\_2
362. Vieira, M., Pinheiro, C., Fernandes, R., Noronha, J. P., & Prudêncio, C. (2014). Antimicrobial activity of quinoxaline 1,4-dioxide with 2- and 3-substituted derivatives. *Microbiological Research*, 169(4), 287–293. Doi: 10.1016/j.micres.2013.06.015
363. Viitanen, J., Haataja, H., & Männistö, P. T. (1985). Concentrations of metronidazole and tinidazole in male genital tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(6), 812–814. Doi: 10.1128/AAC.28.6.812
364. Villalobos-Rocha, J. C., Sánchez-Torres, L., Noguera-Torres, B., Segura-Cabrera, A., García-Pérez, C. A., Bocanegra-García, V., Palos, I., Monge, A., & Rivera, G. (2014). Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*leishmanial* activity by quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives. *Parasitology Research*, 113(6), 2027–2035. Doi: 10.1007/s00436-014-3850-8
365. Vinge, E., Andersson, K. E., Ando, G., & Lunell, E. (1983). Biological availability and pharmacokinetics of tinidazole after single and repeated doses. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 391–397. Doi: 10.3109/inf.1983.15.issue-4.10
366. Vique-Sánchez, J. L., Caro-Gómez, L. A., Brieba, L. G., & Benítez-Cardoza, C. G. (2020). Developing a new drug against trichomoniasis, new inhibitory compounds of the protein triosephosphate isomerase. *Parasitology International*, 76, 102086. Doi: 10.1016/j.parint.2020.102086
367. Volpato, H., Desoti, V. C., Valdez, R. H., Ueda-Nakamura, T., Silva, S. de O., Sarragiotto, M. H., & Nakamura, C. V. (2015). Mitochondrial dysfunction induced by N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamide is required for cell death of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, 10(6), e0130652. Doi: 10.1371/journal.pone.0130652
368. Voogd, C. E. (1981). On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutation Research*, 86(3), 243–277. Doi: 10.1016/0165-1110(81)90006-3
369. Wachter, B., Syrowatka, M., Obwaller, A., & Walochnik, J. (2014). *In vitro* efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 126(S1), 32–36. Doi: 10.1007/s00508-014-0522-8
370. Wagner, G., & Levin, R. (1978). Oxygen tension of the vaginal surface during sexual stimulation in the human. *Fertility and Sterility*, 30(1), 50–53. Doi: 10.1016/s0015-0282(16)43395-9
371. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174. Doi: 10.1002/jcc.20035
372. Wang, R., Lai, L., & Wang, S. (2002). Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *Journal of computer-aided molecular design*, 16(1), 11–26. Doi: 10.1023/a:1016357811882
373. Wang, X., Martínez, M.-A., Cheng, G., Liu, Z., Huang, L., Dai, M., Chen, D., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). The critical role of oxidative stress in the toxicity and metabolism of quinoxaline 1,4-di-N-oxides *in vitro* and *in vivo*. *Drug Metabolism Reviews*, 48(2), 159–182. Doi: 10.1080/03602532.2016.1189560
374. Wendel, K. A., Rompalo, A. M., Erbeling, E. J., Chang, T.-H., & Alderete, J. F. (2002a). Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a sexually transmitted diseases clinic. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(4), 558–561. Doi: 10.1086/341832
375. Wendel, K. A., Rompalo, A. M., Erbeling, E. J., Chang, T.-H., & Alderete, J. F. (2002b). Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a sexually transmitted diseases clinic. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(4), 558–561. Doi: 10.1086/341832
376. Whitebread, S., Hamon, J., Bojanic, D., & Urban, L. (2005). Keynote review: *in vitro* safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. *Drug Discovery Today*, 10(21), 1421–1433. Doi: 10.1016/S1359-6446(05)03632-9
377. WHO-2021b. Workowski, K. A., Bachmann, L. H., Chan, P. A., Johnston, C. M., Muzny, C. A., Park, I., Reno, H., Zenilman, J. M., & Bolan, G. A. (2021). WHO-2021: Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(4), 1–187. Doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1
378. Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(e31). Doi: 10.1017/s1462399409001252
379. Williams, C. F., Lloyd, D., Kolarich, D., Alagesan, K., Duchêne, M., Cable, J., Williams, D., & Leitsch, D. (2012). Disrupted intracellular redox balance of the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens* by 5-nitroimidazoles and garlic-derived compounds. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 62–73. Doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.011
380. Willson, R. L., & Searle, A. J. (1975). Metronidazole (Flagyl): iron catalysed reaction with sulphhydryl groups and tumour radiosensitisation. *Nature*, 255(5508), 498–500. Doi: 10.1038/255498a0

381. Wølner-Hanssen, P., Krieger, J. N., Stevens, C. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L., Critchlow, C., DeRouen, T., Hillier, S., & Holmes, K. K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *The Journal of the American Medical Association*, 261(4), 571–576. Doi: 10.1001/jama.1989.03420040109029
382. Wood, B. A., & Monro, A. M. (1975). Pharmacokinetics of tinidazole and metronidazole in women after single large oral doses. *The British Journal of Venereal Diseases*, 51(1), 51–53. Doi: 10.1136/sti.51.1.51
383. Xu, F., Cheng, G., Hao, H., Wang, Y., Wang, X., Chen, D., Peng, D., Liu, Z., Yuan, Z., & Dai, M. (2016). Mechanisms of Antibacterial Action of Quinoxaline 1,4-di-N-oxides against *Clostridium perfringens* and *Brachyspira hyodysenteriae*. *Frontiers in Microbiology*, 7. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01948
384. Yang, J., Ou, B., Wise, M. L., & Chu, Y. (2014). In vitro total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides. *Food Chemistry*, 160, 338–345. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.059
385. Yang, Shaoyan, Zhao, W., Wang, H., Wang, Y., Li, J., & Wu, X. (2018). *Trichomonas vaginalis* infection- associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 228, 166–173. Doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.06.031
386. Yang, Shenshu, & Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467(1–2), 1–12. Doi: 10.1007/s11010-019-03667-9
387. Yang, W., Ip, S.-P., Liu, L., Xian, Y.-F., & Lin, Z.-X. (2020). *Uncaria rhynchophylla* and its major constituents on central nervous system: A review on their pharmacological actions. *Current Vascular Pharmacology*, 18(4), 346–357. Doi: 10.2174/1570161117666190704092841
388. Yarlett, N., Martinez, M. P., Ali Moharrami, M., & Tachezy, J. (1996). The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78(1–2), 117–125. Doi: 10.1016/s0166-6851(96)02616-3
389. Yavarpour-Bali, H., Ghasemi-Kasman, M., & Pirzadeh, M. (2019). Curcumin-loaded nanoparticles: a novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4449–4460. Doi: 10.2147/ijn.s208332
390. Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *SLAS Discovery*, 4(2), 67–73. Doi: 10.1177/108705719900400206
391. Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. Doi: 10.1155/2014/186864

---

Manuel Lacueva Arnedo  
work.mlav@gmail.com

**Título de la revisión:** Historia y evolución del tratamiento frente a *Trichomonas vaginalis*.

**Título de la Tesis:** Historia y evolución del tratamiento frente a *Trichomonas vaginalis*: desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas

**Directores:** José Antonio Escario García-Trevijano y Alexandra Ibáñez Escribano.

**Centro de realización:** Unidad de Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

**Centro de presentación:** Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

**Fecha de lectura:** 16 de abril de 2024.

# HIPERINFESTACIÓN POR *STRONGYLOIDES STERCORALIS* TRAS EL USO DE INMUNOSUPRESORES EN LA TERAPIA FRENTE AL SARS-COV-2

## RESUMEN

## ABSTRACT

## ABREVIATURAS

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

### 1.2. CICLO BIOLÓGICO

### 1.3. CLÍNICA

- 1.3.1 Estrongiloidosis aguda
- 1.3.2 Estrongiloidosis crónica
- 1.3.3 Estrongiloidosis diseminada
- 1.3.4 Síndrome de hiperinfestación

### 1.4. DIAGNÓSTICO

- 1.4.1 Microscopía
- 1.4.2 Endoscopia y biopsia
- 1.4.3 Diagnóstico molecular
- 1.4.4 Serología

### 1.5. TRATAMIENTO

### 1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

## 2. JUSTIFICACIÓN

## 3. OBJECTIVES

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO

### 4.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

### 4.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

### 4.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA

### 5.2. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA

#### 5.2.1 Características casos clínicos

- 5.2.1.1. Sintomatología observada en los casos clínicos

### 5.3. PORCENTAJE DE SÍNDROME DE HIPERINFESTACIÓN

#### 5.3.1 Características de los pacientes

#### 5.3.2 Situación en España

### 5.4. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

### 5.5. PROTOCOLOS DE CRIBADO

### 5.6. COINFECCIÓN EN INMIGRANTES

## 6. DISCUSIÓN

## 7. CONCLUSIONES

## 8. REFERENCIAS

# Hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis* tras el uso de inmunosupresores en la terapia frente al SARS-CoV-2

## Resumen

### Introducción

---

**D**urante la pandemia de SARS-CoV-2 se llevó a cabo una terapia inmunosupresora. Debido a esto, aumenta la probabilidad de la aparición de infecciones oportunistas como la estrombiloidosis, desencadenando un crecimiento desmesurado del helminto, y provocando así el denominado "síndrome de hiperinfestación".

# Resumen

## Ojetivo

---

**E**l objetivo principal de este trabajo de fin de grado es realizar una revisión sistemática sobre la reaparición de la infestación latente de *Strongyloides stercoralis* en pacientes que reciben terapia inmunosupresora por COVID-19.

## Métodos

---

**R**evisión sistemática de los artículos recuperados en las bases de datos MEDLINE, Embase y Scopus.

## Resultados y discusión

---

**D**e 105 artículos recuperados, tras la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 21 artículos. La prevalencia de la coinfección de estrongiloidosis/COVID-19 es difícil de determinar debido a la falta de conocimiento y de diagnóstico. La mayoría de los casos son importados de zonas endémicas, por lo que es importante tener en cuenta exposición epidemiológica. El perfil característico de la coinfección son hombres de edad media. El tratamiento prevalente es la ivermectina.

## Conclusión

---

**Durante la pandemia de COVID-19 ha aumentado el impacto de la estrongiloidosis y se ha puesto de relieve la necesidad de unificar un protocolo de cribado para detectar y tratar precozmente las formas complicadas de estrongiloidosis.**

# Hyperinfestation by *Strongyloides stercoralis* after the use of Immunosuppressants in therapy against SARS-CoV-2

KEYWORDS: *Strongyloides stercoralis*; SARS-CoV-2; COVID-19; strongyloidiasis; immunosuppression.

## Abstract

### Introduction

---

**D**uring the SARS-CoV-2 pandemic, immunosuppressive therapy was used. This increases the probability of opportunistic infections such as strongyloidiasis, leading to an overgrowth of the helminth, thus causing "hyperinfestation syndrome".

# Abstract

## Objective

---

The main objective of this final degree project is to carry out a systematic review of the recurrence of latent *Strongyloides stercoralis* infestation in patients receiving immunosuppressive therapy by COVID-19.

## Methods

---

Systematic review of articles retrieved from databases MEDLINE, Embase and Scopus.

## Results and discussion

---

Out of 105 articles retrieved, after application of the inclusion and exclusion criteria, 21 articles were selected. The prevalence of strongyloidiasis/COVID-19 co-infection is difficult to determine due to lack of knowledge and diagnosis. Most cases are imported from endemic areas, so it is important to take epidemiological exposure into account. The characteristic profile of co-infection is middle-aged men. Prevalent treatment is ivermectin.

## Conclusions

---

During the COVID-19 pandemic, the impact of strongyloidiasis has increased and the need for a unified screening protocol for early detection and treatment of complicated forms of strongyloidosis has been highlighted.

# Abreviaturas

**CAMAT:** Comité de Asesoramiento sobre Medicina Tropical y Viajes

**CDC:** Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

**COVID-19:** Enfermedad por coronavirus 2019

**DeCS:** Descriptores de Ciencias de la Salud

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**ETD:** Enfermedad Tropical Desatendida

**h:** horas

**HTLV-1:** Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

**IFAT:** técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos

**kg:** kilogramos

**LAMP:** Loop mediated isothermal amplification

**LIPS:** Inmunoprecipitación con luciferasa

**MeSH:** Medical Subject Heading

**µg:** microgramos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**RECOVERY:** Randomised Evaluation of COVID-19 thERapY

***S. stercoralis:*** *Strongyloides stercoralis*

**SH:** Síndrome de hiperinfestación

**STH:** Helmintiasis transmitidas por el suelo

**SARS-CoV-2:** Severe respiratory syndrome coronavirus 2

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**WGO:** Organización Mundial de Gastroenterología

# 1 INTRODUCCIÓN

La estrongiloidosis es una enfermedad causada por el nemátodo rabdítido *Strongyloides stercoralis* (Figura 1).



Figura 1. *Strongyloides stercoralis* en heces, análisis microscópico (Fuente: OMS)<sup>1</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado las helmintiasis transmitidas por el suelo (STH), como la estrongiloidosis, como una enfermedad tropical desatendida (ETD)<sup>2</sup>.

Se trata de un nemátodo con capacidad de persistir y replicarse en el hospedador a través de su ciclo de autoinfección, pudiendo producir sintomatología grave en inmunosuprimidos (especialmente los tratados con corticoides), pacientes con SARS-CoV-2, pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), alcoholismo, la presencia de tumores sólidos o neoplasias hematológicas o ser receptor de un trasplante<sup>3,4</sup>.

## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que afecta a 100 millones de personas en el mundo, con mayor prevalencia en las zonas tropicales y subtropicales como las Islas del Caribe, Sureste asiático, América Latina y África subsahariana, también encontrándose en el sur, este y centro de Europa<sup>5,6</sup>. Sin embargo, el estudio de Pereira *et al.*, indica que el 83,3% de los casos descritos ocurren fuera de las zonas endémicas<sup>7</sup>.

Debido a las dificultades en el diagnóstico la prevalencia puede estar infravalorada en muchos países<sup>8</sup>. Se estima que entre el 10% y el 40% de la población de las zonas tropicales y subtropicales están infectadas, pudiendo llegar al 60% en países de escasos recursos<sup>9</sup>. La prevalencia de la infección va aumentando debido a la mala higiene personal, el desabastecimiento de agua potable, las medidas sanitarias insuficientes y la falta de conocimiento sobre la enfermedad en zonas endémicas<sup>6</sup>.



## 1.2. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis* se esquematiza en la Figura 4. Las larvas rhabditiformes (estadio diagnóstico), se expulsan en las heces del hospedador definitivo, generalmente humanos. Estas pueden desarrollarse a larvas filariformes infecciosas o desarrollarse a machos y hembras adultas los cuales producen huevos al aparearse. De estos huevos nacen larvas rhabditiformes que se convierten en larvas filariformes (estadio infeccioso)<sup>10</sup>.

Las larvas filariformes se encuentran en el suelo y son capaces de penetrar la piel del hospedador, entrar al sistema circulatorio y migrar a los pulmones, siendo capaces de penetrar al espacio alveolar. Tras ascender el árbol traqueobronquial, las larvas en su último estadio son deglutidas alcanzando el intestino delgado. También se piensa que, alternativamente pueden llegar al intestino a través de las vísceras abdominales o tejido conjuntivo. En el intestino las larvas se convierten en adultas hembras y se alojan en la submucosa del intestino delgado donde producen huevos por partenogénesis, dando lugar a larvas rhabditiformes que se pueden expulsar por las heces o causar autoinfección. Las larvas rhabditiformes pueden convertirse en larvas filariformes en el intestino grueso o región perianal, penetrando nuevamente en el hospedador y realizando nuevos ciclos evolutivos, que dan lugar a una infección de larga duración<sup>10</sup>.

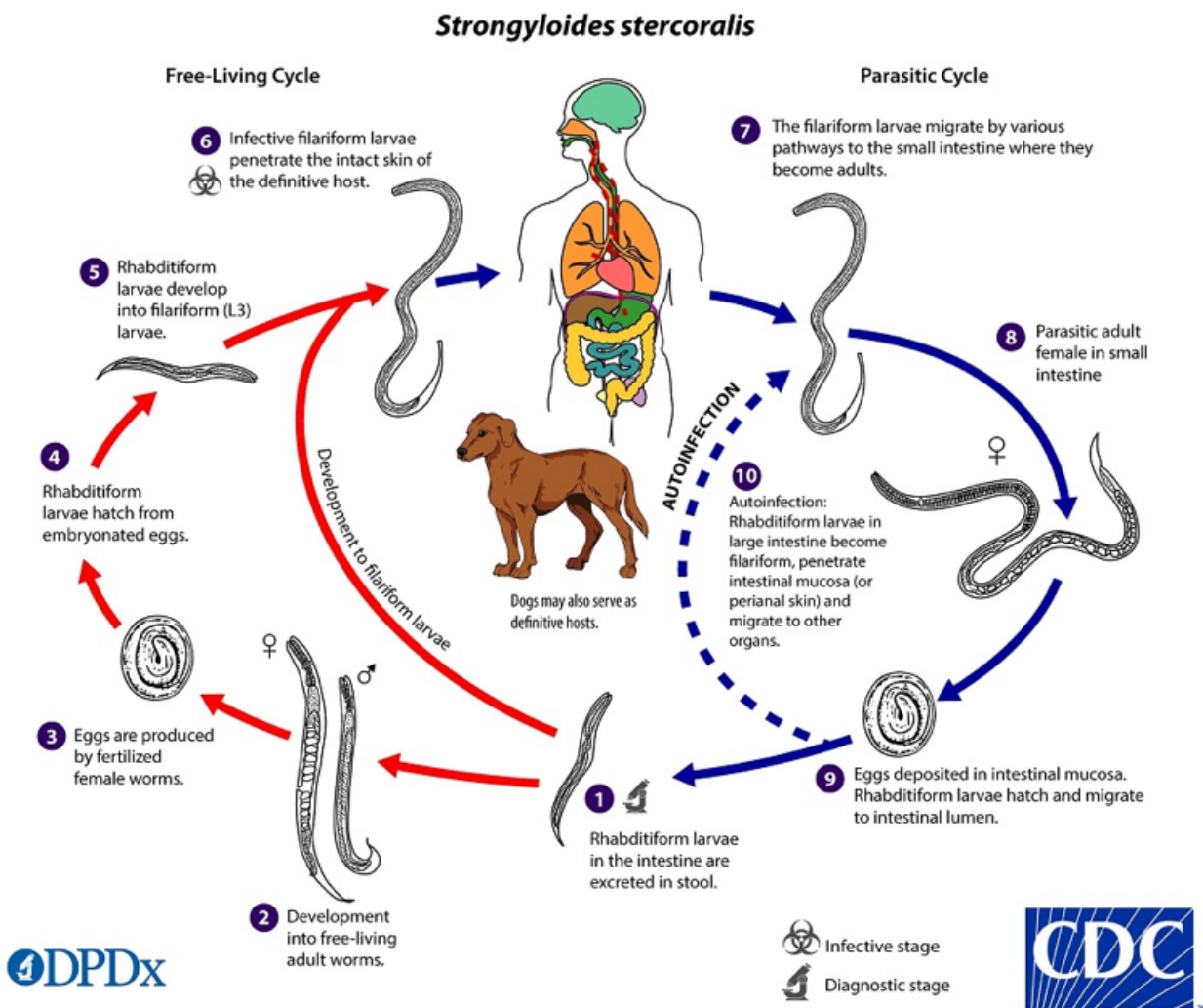


Figura 4. Ciclo biológico de *S. stercoralis* (Fuente: CDC)<sup>10</sup>.

## 1.3. CLÍNICA

La clínica de esta patología suele ser asintomática, pero hay pacientes que presentan síntomas gastrointestinales, cutáneos o pulmonares y eosinofilia<sup>11</sup>. Sin embargo, la sintomatología se puede dividir en función de la fase en la que se encuentre la infección:

### 1.3.1. *Estrongiloidosis aguda*

Un tercio de los pacientes con estrongiloidiasis aguda son asintomáticos<sup>12</sup>. Los síntomas están relacionados con la invasión de la piel por la larva, pudiendo producir un tipo de lesión cutánea llamada *larva currens*. Además, puede aparecer irritación en la tráquea y tos seca debido a la migración de la larva desde los pulmones al intestino. También es común síntomas gastrointestinales como diarrea, estreñimiento, dolor abdominal o anorexia<sup>5</sup>.

### 1.3.2. *Estrongiloidosis aguda*

La mayoría de los infestados inmunocompetentes pueden ser asintomáticos durante décadas y el único indicativo de la infestación es la eosinofilia, estando presente en un 75% de los pacientes<sup>5</sup>. Para aquellos pacientes con sintomatología, lo más común es diarrea, estreñimiento, vómitos intermitentes, disnea, sibilancias, pérdida de peso, urticaria y/o *larva currens* (lesión cutánea migratoria)<sup>4,5</sup>.

### 1.3.3. *Estrongiloidosis diseminada*

La estrongiloidosis diseminada ocurre cuando las larvas, además de migrar a los órganos habituales, se diseminan a otros órganos como pueden ser el sistema nervioso central, el hígado, el sistema linfático o el tracto urinario<sup>13</sup>. La clínica más destacada de la enfermedad diseminada es sepsis, debido a que la larva transporta microorganismos al torrente sanguíneo<sup>5</sup>.

### 1.3.4. *Síndrome de hiperinfestación*

El síndrome de hiperinfestación (SH) generalmente ocurre en pacientes con estrongiloidosis crónica que se someten a un tratamiento inmunosupresor, produciendo un aumento de la tasa de infestación<sup>4</sup>. La sintomatología está relacionada con la localización de las larvas, siendo el intestino, el pulmón y la piel las zonas habituales de la infestación por *S. stercoralis*<sup>13</sup>.



Figura 5. *Larva currens* en síndrome de hiperinfestación por *S. stercoralis*<sup>14</sup>.

Las manifestaciones digestivas son dolor abdominal, náuseas, vómitos, obstrucción del íleon y diarrea que puede dar lugar a hipoalbuminemia y edema periférico<sup>4,5</sup>. Las alteraciones respiratorias son síndrome de Löffler, tos, disnea, sibilancias, dolor pleurítico, hemoptisis, neumonía y distrés respiratorio. Las manifestaciones cutáneas (Figura 5) son *larva currens* que se localiza habitualmente en nalgas, ingles, abdomen y tronco y lesiones purpúricas<sup>13</sup>

## 1.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la estrongiloidiasis no está estandarizado y se necesitan varias pruebas para la correcta detección<sup>13</sup>. Existen pruebas directas (examen microscópico y cultivo larvario, endoscopia y biopsia, y diagnóstico molecular) e indirectas (serología).

### 1.4.1. Microscopía

El examen microscópico de las heces es un clásico en el diagnóstico de estrongiloidiasis, siendo la sensibilidad de esta prueba del 30%. Realizando el examen con muestras de heces triplicadas, con métodos de concentración (técnica de Baermann o método de Ritchie modificado) o con métodos de cultivo (cultivo en Agar, cultivo Harada-Mori), la sensibilidad puede aumentar a 70-80%<sup>6</sup>. Ante un cuadro de SH, se podría realizar en análisis de muestras de esputo o líquido cefalorraquídeo<sup>13</sup>.

### 1.4.2. Endoscopia y biopsia

El aspirado gastrointestinal o la biopsia duodenal se podrían realizar en caso de SH<sup>15</sup>. El estudio de Kishimoto *et al.*, muestra que se diagnosticó estrongiloidiasis en el 71,4% de los pacientes mediante muestras histopatológicas, siendo la observación endoscópica y las biopsias una herramienta importante para el diagnóstico de *S. stercoralis*<sup>16</sup>.

### 1.4.3. Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular es más específico, sensible y flexible que el resto de las pruebas directas, pero tiene dificultad para diagnosticar en infecciones agudas ya que se necesita una carga parasitaria alta para ser suficientemente sensibles<sup>13,15</sup>. Algunas de las técnicas utilizadas son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras variables como PCR en tiempo real o la técnica amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés)<sup>13,15</sup>.

### 1.4.4. Serología

Por último, se puede realizar el diagnóstico a través de técnicas indirectas, mediante la detección de anticuerpos específicos frente antígenos de *S. stercoralis*<sup>13</sup>. La sensibilidad y la especificidad de estas pruebas son muy variables (ya que dependen del método, antígeno, isotipo del anticuerpo, punto de corte y población de estudio), pudiendo ser de 56-100% y 29-100%, respectivamente<sup>15</sup>.

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se ha utilizado en el 85-90% de los pacientes, siendo la sensibilidad de esta prueba de 82-95%. Esta sensibilidad puede ser inferior en pacientes inmunosuprimidos y no detecta si la infestación es presente o pasada. Además, existe reactividad cruzada con infestaciones de helmintos como filariosis, esquistosomosis y ascariosis<sup>6</sup>.

La tecnología de inmunoprecipitación con luciferasa (LIPS) utiliza anticuerpos frente a dos tipos de antígenos recombinantes específicos de *Strongyloides* spp. y muestra una eficacia superior que los otros inmunoensayos<sup>5</sup>. Además, no muestra reactividad cruzada con las filariosis linfáticas<sup>6</sup>.

“Esta sensibilidad puede ser inferior en pacientes inmunosuprimidos y no detecta si la infestación es presente o pasada.”

## 1.5. TRATAMIENTO

El tratamiento de primera línea frente a esta patología es la ivermectina y como segunda línea, el albendazol<sup>17</sup>.

“*La ivermectina produce alteración del sistema neuromuscular mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana por la formación de canales de cloro<sup>18</sup>. La posología es una dosis única de 200 µg/kg<sup>19</sup>.*”

La [ivermectina](#) produce alteración del sistema neuromuscular mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana por la formación de canales de cloro<sup>18</sup>. La posología es una dosis única de 200 µg/kg<sup>19</sup>. Sin embargo, según la guía Terapéutica Antimicrobiana<sup>20</sup>, el tratamiento es 200 µg/kg/día de ivermectina, durante 2 días. Repitiéndose a las 2 semanas en pacientes inmunosuprimidos. Cuando se trate de pacientes con SH el tratamiento se prolonga al menos durante 2 semanas o se asocia la ivermectina a albendazol.

La ivermectina se comercializó en España en 2021 como Ivergalen<sup>®</sup>, por lo que durante la pandemia de COVID-19 se tenía que pedir como medicamento extranjero, lo que complicaba la estrategia del tratamiento<sup>3,21</sup>.

El [albendazol](#), se fija a los microtúbulos, impidiendo la unión de la β-tubulina, deteniendo así la división celular<sup>18</sup>. La posología es de 400mg/12 h durante 7 días<sup>22</sup>.

## 1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

La Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) afirma que no hay disponible ningún régimen profiláctico o vacuna<sup>23</sup>. Según la OMS<sup>1</sup>, no se ha desarrollado una estrategia de salud pública para la prevención de la estrongiloidiasis.

Se trata de una patología que provoca alta mortalidad si se llega a desarrollar una enfermedad diseminada, por lo que el cribado de los pacientes asintomáticos es importante para prevenir el SH. Los pacientes de áreas endémicas que se tratan con corticoesteroides deberían de considerarse de alto riesgo para el SH, pudiendo tratarse de forma empírica con ivermectina<sup>5</sup>.

“*Se trata de una patología que provoca alta mortalidad si se llega a desarrollar una enfermedad diseminada, por lo que el cribado de los pacientes asintomáticos es importante para prevenir el SH.*”

## 2 JUSTIFICACIÓN

El coronavirus SARS-CoV-2 (Severe respiratory syndrome coronavirus 2) es un tipo de coronavirus que se detectó por primera vez en 2019 en la ciudad de Wuhan (China)<sup>24</sup>. Causa una enfermedad respiratoria denominada COVID-19 que se diseminó rápidamente convirtiéndose en pandemia<sup>25</sup>.

Durante la pandemia de SARS-CoV-2, alrededor del 20% de los infectados desarrollaron neumonía grave, caracterizada por el daño directo producido por el virus y por la hiperinflamación. Debido a un déficit de respuesta eficiente ante los antivirales, se propuso una terapia antiinflamatoria<sup>25</sup>. El ensayo RECOVERY (Randomised Evaluation of COVID-19 thERapY) publicó que el uso de dexametasona en pacientes hospitalizados por COVID-19 disminuyó la mortalidad por fallo respiratorio<sup>26</sup>. En general, el uso de dexametasona es seguro cuando se usa a bajas dosis y durante cortos periodos de tiempo<sup>27</sup>.

“ El ensayo RECOVERY (Randomised Evaluation of COVID-19 thERapY) publicó que el uso de dexametasona en pacientes hospitalizados por COVID-19 disminuyó la mortalidad por fallo respiratorio<sup>26</sup>. ”

---

Según el estudio de Zamarrón *et al.* la dexametasona consiguió reducir el tiempo de estancia hospitalaria mientras que la metilprednisolona y la prednisona no lo consiguieron. Sin embargo, la metilprednisolona ha conseguido reducir los días de uso de ventilación mecánica y la mortalidad en pacientes con COVID-19<sup>28</sup>.

El problema del uso de corticoides es la inmunosupresión que generan, potenciando el riesgo de la aparición de otras infecciones<sup>24</sup>. No obstante, muchos sanitarios no tuvieron en cuenta el riesgo del uso de la dexametasona en pacientes infectados con *S. stercoralis* sin tratar o diagnosticar, produciendo **síndrome de hiperinfestación**<sup>29</sup>.

Este TFG se centra en el estudio de la reactivación de la infestación crónica conocida como estrongiloidiasis durante la terapia inmunosupresora de la COVID-19.

“ Según el estudio de Zamarrón *et al.* la dexametasona consiguió reducir el tiempo de estancia hospitalaria mientras que la metilprednisolona y la prednisona no lo consiguieron. Sin embargo, la metilprednisolona ha conseguido reducir los días de uso de ventilación mecánica y la mortalidad en pacientes con COVID-19<sup>28</sup>. ”

---

## **3** OBJETIVOS

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es realizar una revisión sistemática sobre la información científica existente de la coinfección entre *Strongyloides stercoralis* y *Severe respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

#### **3.2.1. Numero de casos**

Identificar el número de casos publicados de pacientes inmunosuprimidos por SARS-CoV-2 coinfectados con *Strongyloides stercoralis*.

#### **3.2.2. Sintomatología característica**

Describir la sintomatología característica de la coinfección entre *Strongyloides stercoralis* y el SARS-CoV-2.

#### **3.2.3. Influencias**

Identificar las posibles influencias para desarrollar hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis*.

#### **3.2.4. Pruebas de diagnóstico**

Describir las pruebas de diagnóstico utilizados en los casos de coinfección entre *Strongyloides stercoralis* y el SARS-CoV-2.

#### **3.2.5. Tratamientos**

Describir los tratamientos utilizados en los casos de coinfección entre *Strongyloides stercoralis* y el SARS-CoV-2.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO

Se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica existente acerca del Síndrome de hiperinfestación por *S. stercoralis* y SARS-CoV-2.

### 4.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Después de identificar el tema de estudio se realiza la búsqueda de información mediante la selección de las palabras clave y su conversión en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS). De esta manera se indexan los documentos para facilitar la búsqueda. Seguidamente, se determinan los Medical Subject Heading (MeSH): "*Strongyloides stercoralis*", "SARS-CoV-2" and "Coronavirus Infections".

Para realizar la búsqueda se utilizaron las bases de datos MEDLINE, Embase y Scopus, siendo la ecuación de búsqueda de MEDLINE la siguiente: ("*Strongyloides stercoralis*"[Mesh]) AND ("SARS-CoV-2"[Mesh]).

Además, se realiza una búsqueda ampliada utilizando los términos "COVID-19" y "Coronavirus Infections".

### 4.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Con el fin de adecuar la búsqueda a nuestro tema seleccionado, se seleccionan una serie de criterios de inclusión:

- Población de estudio queda restringida a humanos.
- Artículos científicos publicados en inglés o español.
- Artículos publicados desde 2020.

Una vez obtenidos los artículos mediante los criterios de inclusión, se excluyen aquellos que no estén relacionados con el tema de este trabajo mediante la lectura del título, del resumen y del texto completo, además de los duplicados.

### 4.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este TFG ha sido aprobado por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) con el código: TFG.GFA.LAS.BTE.230317.

# 5 RESULTADOS

## 5.1. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA

La búsqueda inicial en base a los términos MeSH arroja 104 resultados, 23 procedentes de MEDLINE, 39 de Embase y 42 de Scopus. Al aplicar los criterios de inclusión y exclusión se obtienen 21 de MEDLINE, 37 de Embase y 33 de Scopus. Además, se añadió un artículo obtenido por búsqueda manual. Se incluyen en la revisión 21 artículos, como se puede apreciar en la Figura 6.

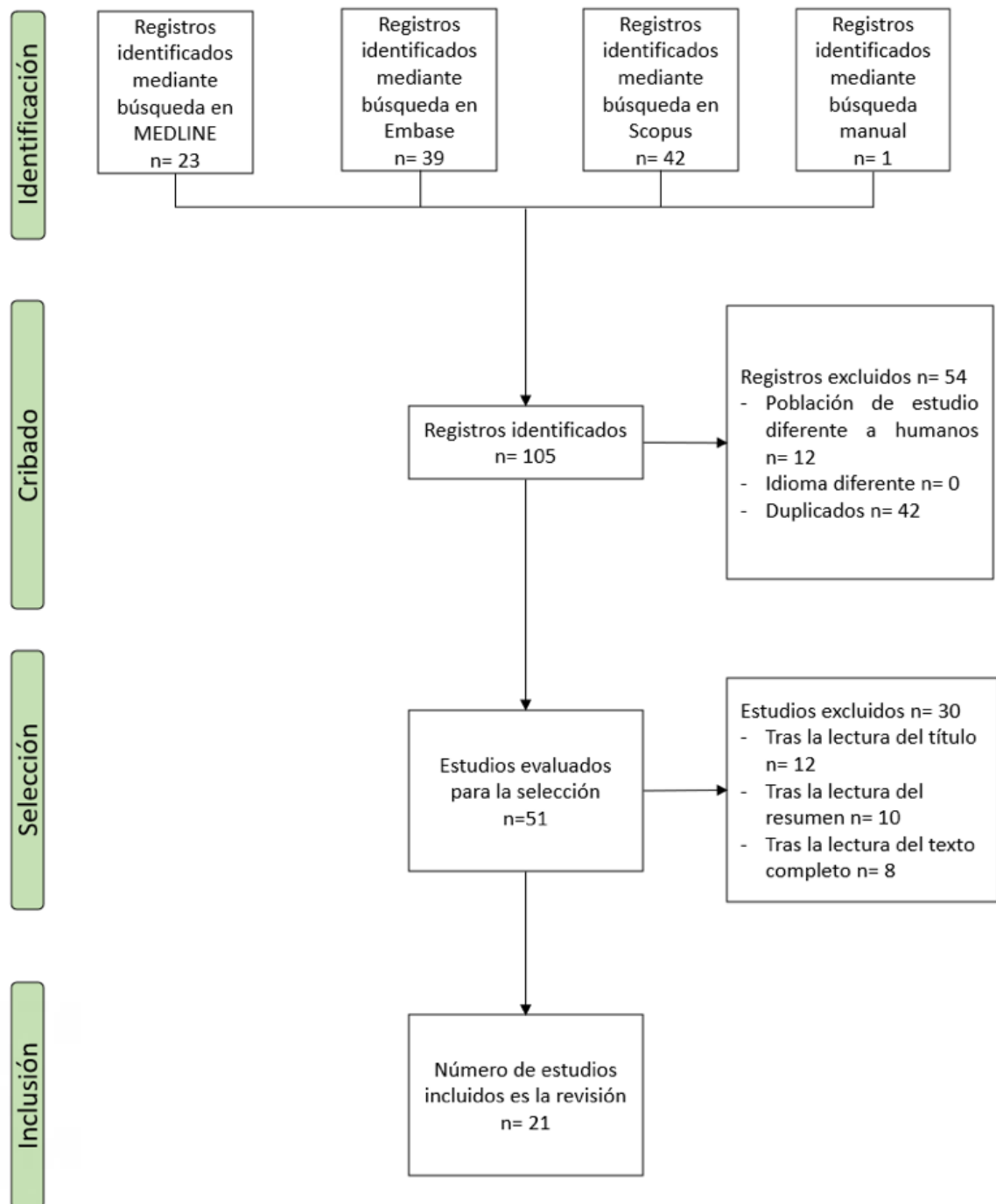


Figura 6. Diagrama de flujo de la identificación y selección de los estudios (Fuente: Producción propia).

## 5.2. DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS

### 5.2.1. Características casos clínicos

Autor, año	País	Sexo	Edad (años)	Procedencia	Terapia inmunosupresora	x	Reactivación	Tratamiento
Lier et al., 2020 <sup>30</sup>	Estados Unidos	M	68	Importado	Metilprednisolona + Tocilizumab	Cultivo de heces	Diseminada	Ivermectina Albendazol
Marchese et al., 2020 <sup>31</sup>	Italia	F	59	Autóctono	Dexametasona + Tocilizumab	Examen microscópico + IFAT		Ivermectina
Gautam et al., 2021 <sup>32</sup>	India	M	53	Autóctono	Metilprednisolona	Examen microscópico	SH	Ivermectina Albendazol
Nakandakari et al., 2021 <sup>33</sup>	Perú	F	4	Autóctono	---	Examen microscópico		Ivermectina
Núñez-Gómez et al., 2021 <sup>34</sup>	España	M	45	Importado	Dexametasona	Serología + Examen microscópico		Ivermectina
Patel et al., 2021 <sup>35</sup>	Estados Unidos	M	72	Importado	Dexametasona	Examen microscópico	Diseminada	Ivermectina
Stylemans et al., 2021 <sup>36</sup>	Bélgica	M	59	Importado	Metilprednisolona + Anakinra	Serología + PCR		Ivermectina
Alkaabba et al., 2022 <sup>37</sup>	Estados Unidos	M	76	Autóctono	Dexametasona	Examen microscópico		Ivermectina
Feria et al., 2022 <sup>38</sup>	España	M	74	Importado	Dexametasona	Serología	Larva currens	Ivermectina
		F	45	Importado	Dexametasona	Serología	SH	Ivermectina
Kim et al., 2022 <sup>39</sup>	Estados Unidos	M	63	Importado	Dexametasona + Baricitinib	Serología	SH	Ivermectina
Singh et al., 2022 <sup>40</sup>	India	M	58	Autóctono	Metilprednisolona	Examen microscópico		Ivermectina Albendazol

**Tabla 1.** Reportes de casos clínicos obtenidos en la revisión. M=Masculino, F=Femenino, SH=síndrome de hiperinfestación, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, IFAT= técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos (Fuente: producción propia).

De los artículos resultantes de la búsqueda sistemática 12 fueron casos clínicos individuales, cuya procedencia, sexo, edad, tratamiento, diagnóstico y clínica presentada se muestran en la tabla 1. Todos los casos fueron resueltos, menos el descrito por Kim *et al.*, en 2022, que resultó en la muerte del paciente<sup>39</sup>. A destacar el caso de una niña de 4 años acontecido en Perú<sup>33</sup>.

Excluyendo el caso que se acaba de nombrar, la edad media de los pacientes es de 61,1 años, siendo más prevalente el género masculino (81,81%). La manera más frecuente de diagnosticar la estrongiloidiasis es el examen microscópico de heces (58,3%) seguido de la serología (41,6%)<sup>30-40</sup>.

De los casos clínicos observados el 58,33% de los pacientes fueron casos importados y el 41,67% autóctonos. De los casos importados que se observan en la Tabla 1, 3 pacientes son procedentes de Ecuador<sup>30,34,36</sup>, 1 de Bolivia<sup>38</sup>, 1 de Honduras<sup>38</sup>, 1 de Camboya<sup>39</sup> y 1 de Nicaragua<sup>35</sup>.

Se trató con ivermectina al 83,3% (10/12) de los pacientes, mientras que se dio terapia combinada (ivermectina+albendazol) en el resto (2/12)<sup>30-40</sup>.

### 5.2.1.1. Sintomatología observada en los casos clínicos

En la Figura 8 se recogen la sintomatología presente en los casos clínicos<sup>30-40</sup>.

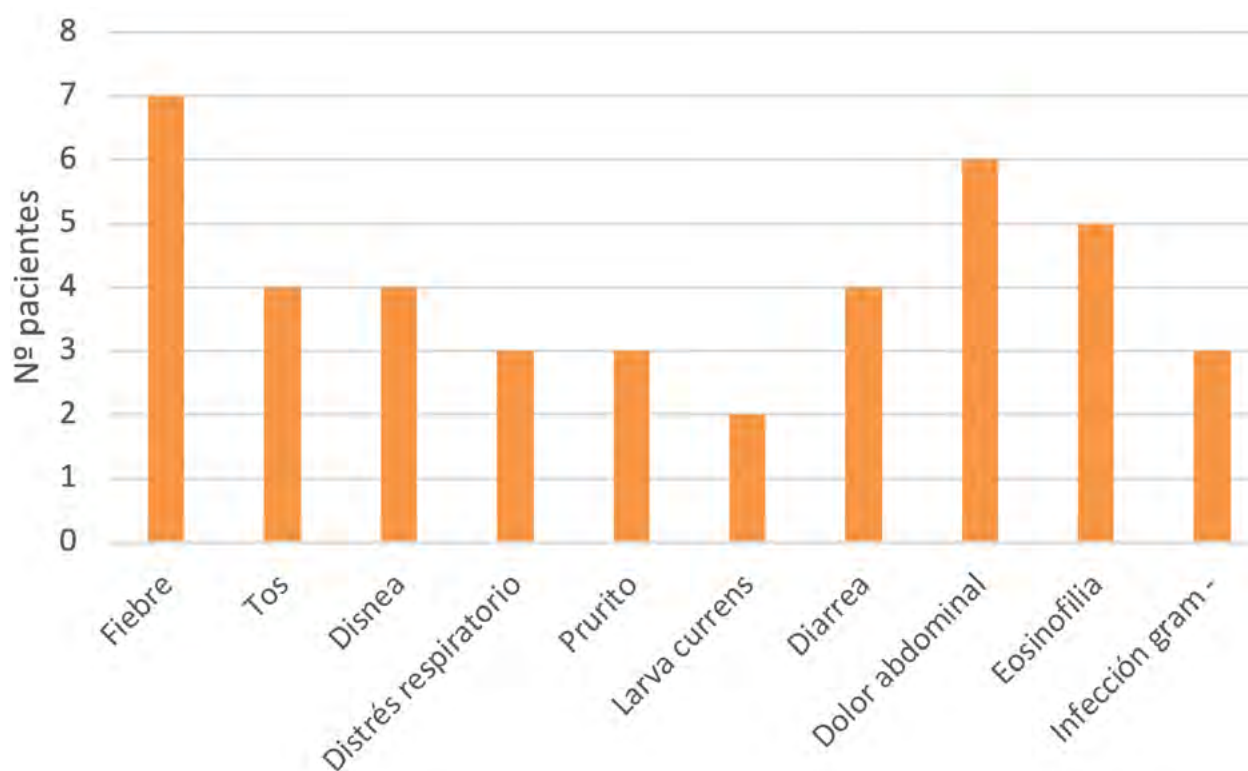


Figura 8. Sintomatología observada debida a la coinfección respecto al número de pacientes en que fue observada (Fuente: producción propia)<sup>30-40</sup>.

## 5.3. PORCENTAJE DE SÍNDROME DE HIPERINFESTACIÓN

En la Tabla 2 se observan 3 artículos obtenidos en la búsqueda sistemática, que recogen casos clínicos de pacientes coinfectados por COVID-19 y *S. stercoralis* a nivel mundial. Esta tabla recoge la proporción de pacientes con SH y el porcentaje de ellos que estuvieron sometidos a terapia inmunosupresora. En el estudio de Seeger *et al.* se reporta la muerte de un paciente<sup>41</sup>.

Autor, año	N.º pacientes con coinfección	N.º pacientes con SH (%)	N.º pacientes con Terapia inmunosupresora (%)
Pereira <i>et al.</i> , 2021 <sup>7</sup>	6	1 (16,7)	6 (100)
Kim <i>et al.</i> , 2022 <sup>39</sup>	7	3 (42,9)	7 (100)
Seeger <i>et al.</i> , 2023 <sup>41</sup>	22	7 (31,8)	6 (85,7)

Tabla 2. Porcentaje observado de síndrome de hiperinfestación (SH) y uso de terapia inmunosupresora en pacientes coinfectados por COVID-19 y *Strongyloides stercoralis* (Fuente: producción propia).

### 5.3.1. Características de los pacientes

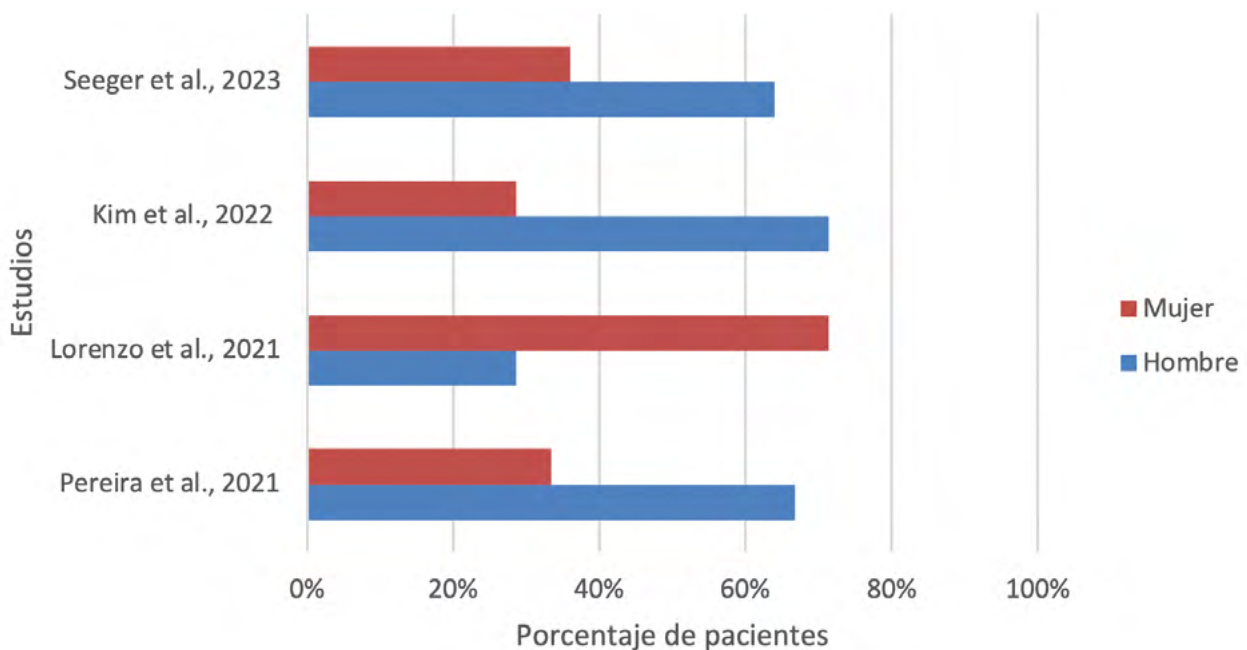
Como se puede apreciar en la siguiente tabla (Tabla 3) la edad media de los pacientes que presentan estrongiloidiasis y COVID-19 está alrededor de 50-60 años.

Si se realiza la media de edad teniendo en cuenta solo aquellos pacientes que han desarrollado hiperinfestación, aumenta en dos estudios mientras que uno disminuye.

Autor, año	N.º casos	Edad media (años)	Edad (años)	Media	SH
Pereira et al., 2021 <sup>7</sup>	6	61,3	53		
Kim et al., 2022 <sup>39</sup>	7	60,9	63,3		
Seeger et al., 2023 <sup>41</sup>	22	54,5	76,57		

**Tabla 3.** Edad media de pacientes coinfectados con COVID-19 y *Strongyloides stercoralis* y edad media de los pacientes que presentan síndrome de hiperinfestación (SH) (Fuente: producción propia).

En la Figura 7 se muestra un diagrama donde se representa la diferencia de sexo en los diferentes estudios obtenidos. Salvo en el estudio de Lorenzo et al., se observan mayores tasas en hombres (60-70%)<sup>27</sup>.



**Figura 7.** Diferencias en el sexo de los pacientes coinfectados (Fuente: producción propia)<sup>7,27,39,41</sup>.

### 5.3.2. Situación en España

Rodríguez-Guardado et al., realizó una encuesta en 2021 a 121 centros para conocer la situación diagnóstica y terapéutica de los coinfectados por COVID-19 y *S. stercoralis* en España. Mediante esta encuesta se planteó la pregunta acerca del cribado de estrongiloidiasis en pacientes con SARS-CoV-23. De los 121 centros, repartidos en las comunidades autónomas como muestra la figura 9, en 22 centros (18%) se realizó el cribado. estrongiloidiasis y COVID-19 está alrededor de 50-60 años.



Figura 8. Número de participantes por Comunidad Autónoma (Fuente: Rodríguez-Guardado et al. <sup>3</sup>).

El cribado se realizó mediante serología en 16 centros, mediante serología y cultivo agar-sangre en 4 centros y 2 centros utilizaron únicamente el cultivo.

Autor, año	N.º centros	N.º pacientes coinfectados	N.º pacientes SH (%)	N.º muertes
Rodríguez-Guardado et al., (2021) <sup>3</sup>	23	227	4 (1,76)	1

Tabla 4. Prevalencia de la coinfección en España en 2021 (Fuente: producción propia)

Por otro lado, Lorenzo et al., en 2021 realizaron un estudio acerca de la influencia del uso de inmunosupresores en pacientes inmigrantes con SARS-CoV-2 y el desarrollo de estrongiloidiasis sintomática en España. Fueron incluidos 86 pacientes de áreas endémicas con diagnóstico de COVID-19 y, mediante pruebas serológicas, se obtuvieron 7 pacientes con diagnóstico positivo en *S. stercoralis*. Solo 3 pacientes (42,86%) habían recibido dexametasona<sup>27</sup>.

## 5.4. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Como se observa en el siguiente diagrama (Figura 10) el método utilizado para diagnosticar la estrongiloidosis es la serología en los 3 estudios, seguido del examen microscópico de heces<sup>7,39,41</sup>.

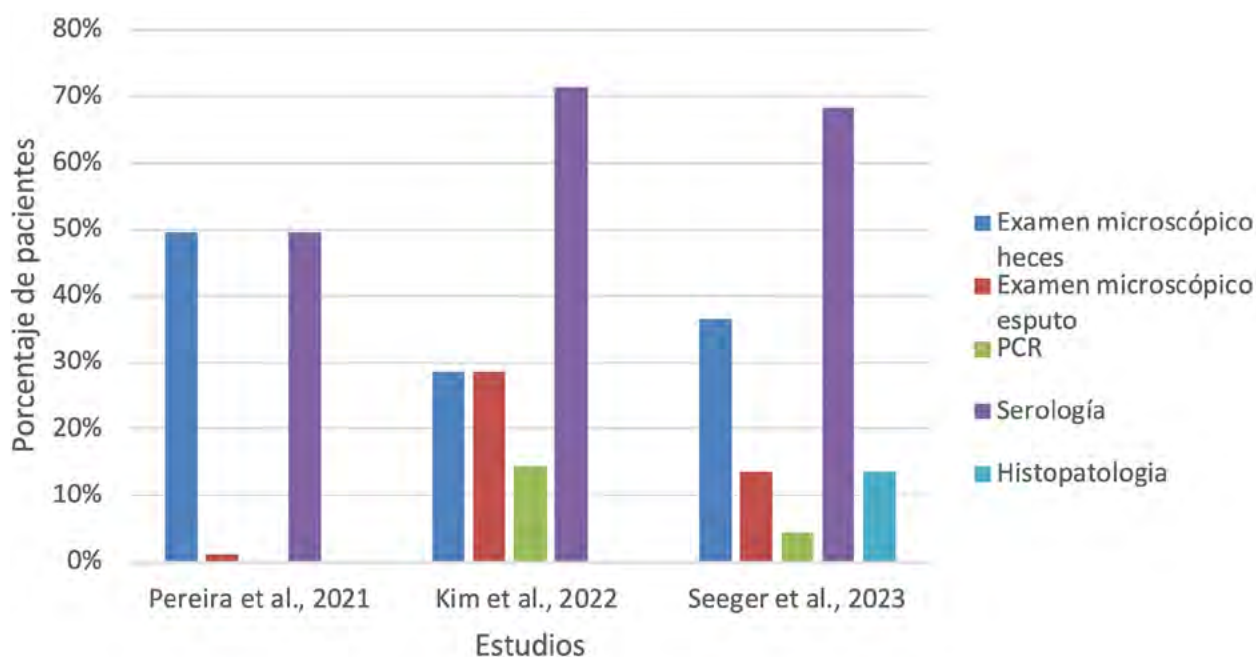


Figura 9. Métodos de diagnóstico de estrongiloidosis según cada estudio (Fuente: producción propia)<sup>7,39,41</sup>.

En la tabla 5 se recogen la posología y la duración del tratamiento de los casos clínicos. El 18,18% de los pacientes reciben una dosis única de ivermectina, el 36,37% reciben 2 dosis y el 45,45% reciben el tratamiento completo de 14 días. En el caso del albendazol, se utiliza la misma posología<sup>30-34,36-40</sup>.

En el caso de Núñez-Gómez et al. el paciente, tras una primera dosis de ivermectina, sufre una erupción maculopapular difusa y ante una posible reacción alérgica, se interrumpe la terapia antihelmíntica. El paciente continúa con prurito y se realiza otro examen de heces, donde se observan larvas de *S. stercoralis*. Consecuentemente, se reinicia el tratamiento con ivermectina<sup>34</sup>. El paciente del caso de Singh et al. presenta una coinfección de *S. stercoralis* y *Ascaris lumbricoides*<sup>40</sup>.

“ En el caso de Núñez-Gómez et al. el paciente, tras una primera dosis de ivermectina, sufre una erupción maculopapular difusa y ante una posible reacción alérgica, se interrumpe la terapia antihelmíntica. ”

Autor, año	Posología	Duración tratamiento
Lier et al., 2020 <sup>30</sup>	Ivermectina (200µg/kg/24h) Albendazol (400mg/12h)	14 días
Marchese et al., 2020 <sup>31</sup>	Ivermectina (200µg/kg)	Única dosis
Gautam et al., 2021 <sup>32</sup>	Ivermectina Albendazol	14 días
Nakandakari et al., 2021 <sup>33</sup>	Ivermectina (1 gotas/kg)	2 días
Núñez-Gómez et al., 2021 <sup>34</sup>	Ivermectina (200µg/kg)	1. Única dosis 2. 14 días
Stylemans et al., 2021 <sup>36</sup>	Ivermectina (200µg/kg)	Única dosis
Alkaabba et al., 2022 <sup>37</sup>	Ivermectina (200µg/kg/24h)	2 días
Feria et al., 2022 <sup>38</sup>	Ivermectina (200µg/kg/24h)	2 días
	Ivermectina (200µg/kg/24h)	2 días
Kim et al., 2022 <sup>39</sup>	Ivermectina (200µg/kg/24h)	14 días
Singh et al., 2022 <sup>40</sup>	Ivermectina (200µg/kg/24h)	14 días
	Albendazol (400mg/12h)	

Tabla 5. Posología y duración del tratamiento antiparasitario de los casos clínicos. (Fuente: producción propia).

El tratamiento más utilizado para la coinfección es la ivermectina como se puede apreciar en la Figura 11. En algunos casos, se ha llegado a utilizar la ivermectina combinada con albendazol, siendo muy raro el uso de este solo.

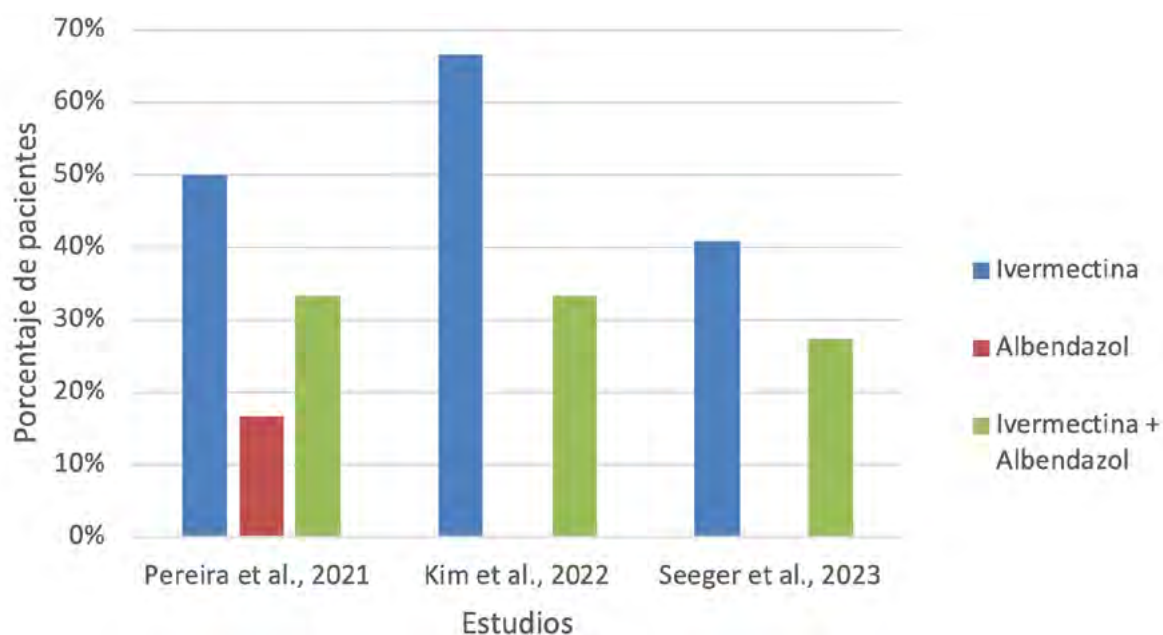


Figura 10. Estrategia de tratamiento de estrongiloidosis en cada estudio (Fuente: producción propia)<sup>739,41</sup>.

## 5.5. PROTOCOLOS DE CRIBADO

De la revisión sistemática se obtienen 4 estudios que tratan sobre protocolos de cribado, se visualizan en la Tabla 6.

Autor	Año	País
Luvira et al., <sup>42</sup>	2022	Tailandia
Vellere et al., <sup>43</sup>	2021	Italia
Carnino et al., <sup>44</sup>	2021	Suiza
Stauffer et al., <sup>45</sup>	2020	Estados Unidos

Tabla 6. Artículos que tratan de protocolos de cribado (Fuente: producción propia).

Luvira et al. indican que antes de iniciar el tratamiento con corticoides para la COVID-19 se debe de evaluar la posible infestación crónica latente por *S. stercoralis*. La estrategia se basa en la recomendación de CATMAT (Comité de Asesoramiento sobre Medicina Tropical y Viajes) de 2016 y proponen el esquema de cribado que se muestra en la Figura 12<sup>42</sup>.

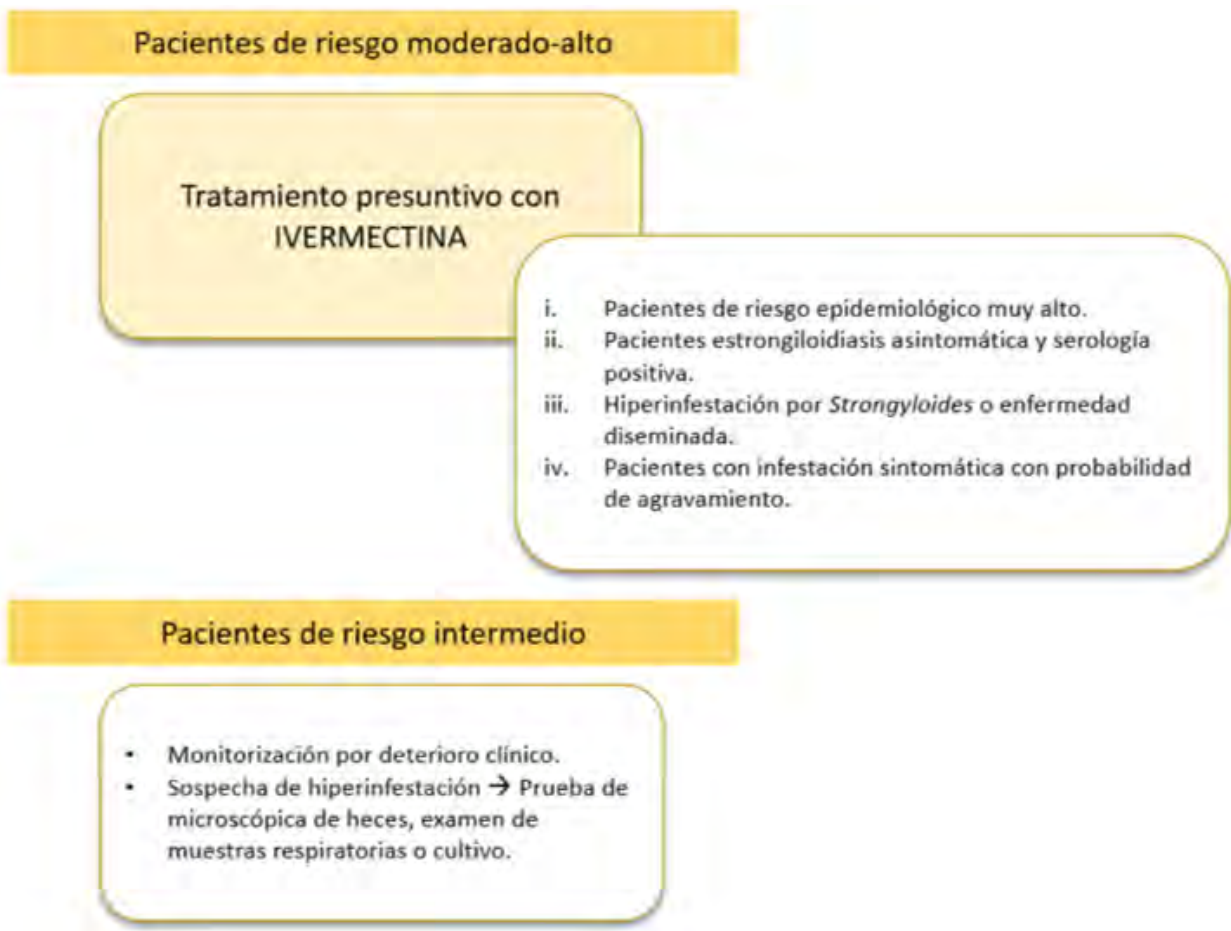


Figura 11. Protocolo de cribado de Luvira et al.<sup>42</sup> (Fuente: producción propia).

Vellere et al. proponen en Italia, un protocolo para pacientes hospitalizados por COVID-19 en un entorno no endémico para evitar la posible diseminación de *S. stercoralis*. El protocolo que se esquematiza en la Figura 13<sup>43</sup>.

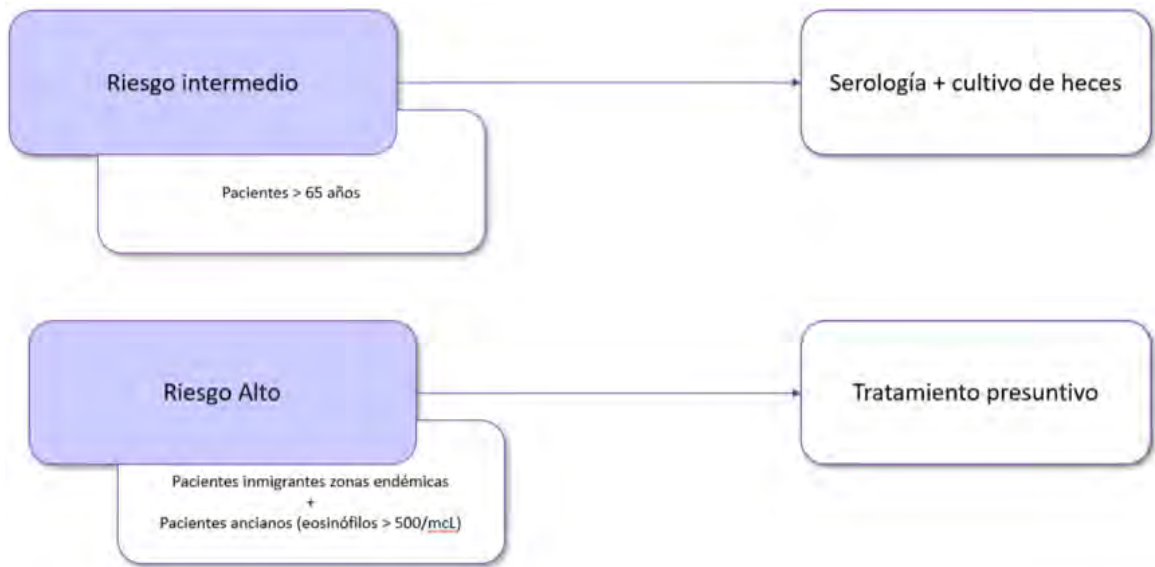


Figura 12. Protocolo de cribado de Vellere et al. <sup>43</sup> (Fuente: producción propia).

El protocolo de Carnino et al. desde Suiza, se puede aplicar para cualquier terapia inmunosupresora (quimioterapia, agentes biológicos o terapia relacionada con SARS-CoV-2). Centra el riesgo del paciente según el estado de inmunosupresión y la exposición epidemiológica, estableciendo 3 grandes grupos según su riesgo de infección (ver Figura 14). De esta manera, se recomienda realizar pruebas de diagnóstico directas cuando el paciente esté inmunosuprimido, ya que hay mayor riesgo de SH y, por lo tanto, mayor eliminación de larvas; y pruebas indirectas cuando el paciente no haya recibido todavía el tratamiento inmunosupresor, ya que la sensibilidad de la serología disminuye durante la inmunosupresión<sup>44</sup>.

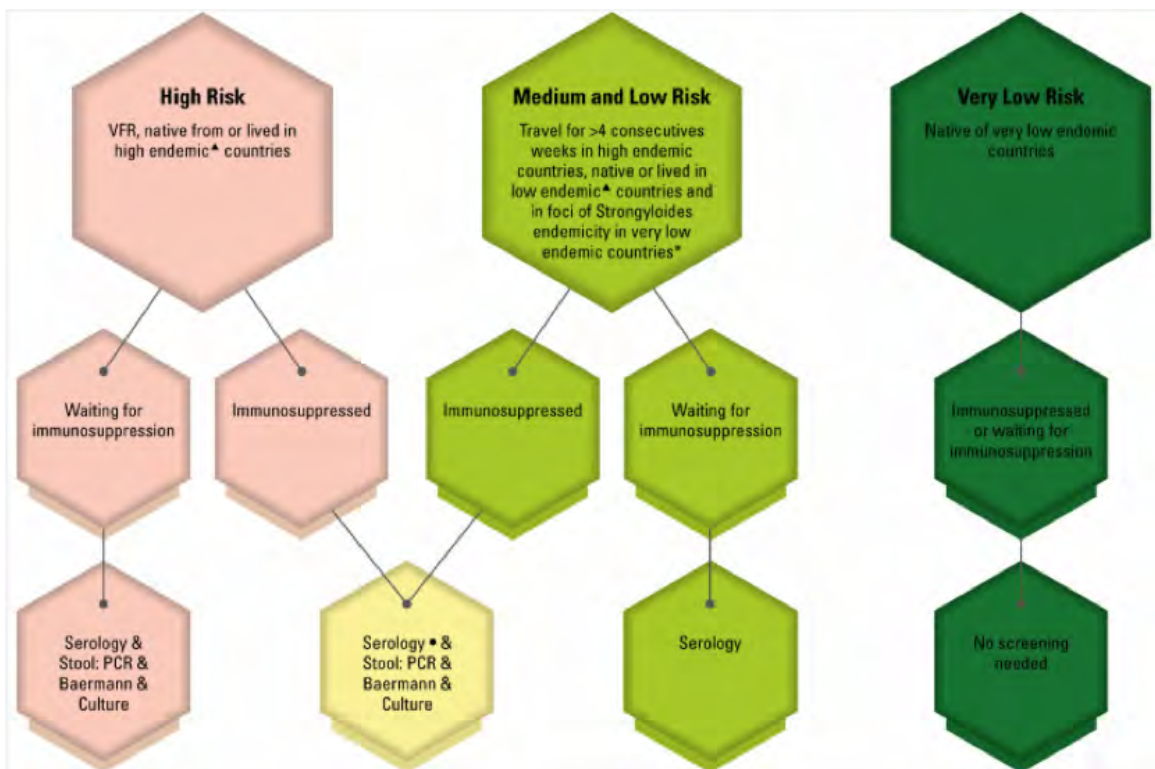


Figura 13. Protocolo de cribado de Carnino et al. <sup>44</sup>.

Stauffer et al., en 2020 presenta una estrategia para evitar el SH durante la pandemia de COVID-19 que se esquematiza en la Figura 15. Divide la estrategia en función de si se trata de un ambiente ambulatorio u hospitalario. Para los pacientes con COVID-19 leve, se aconseja realizar una prueba y tratar. En cambio, para los pacientes con COVID-19 candidatos a dexametasona se recomienda un tratamiento presuntivo con ivermectina<sup>45</sup>.

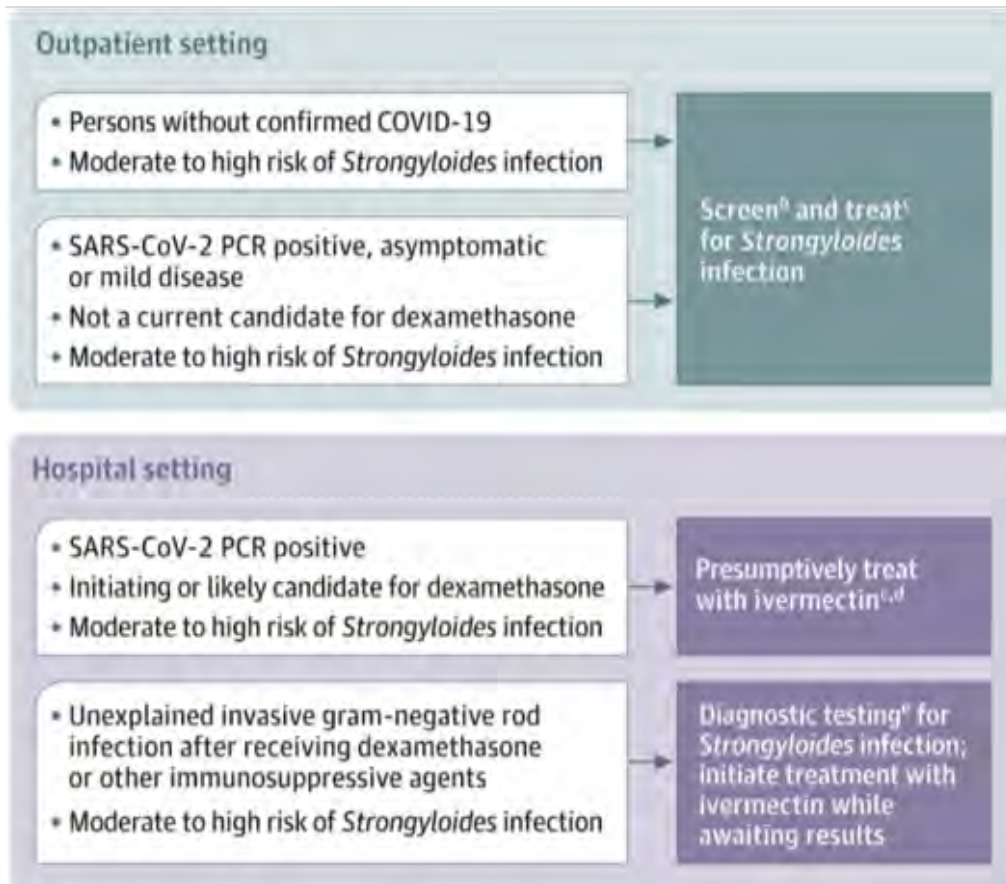


Figura 14. Protocolo de cribado de Stauffer et al.<sup>45</sup>.

Olivera señala que los protocolos de cribado que se basan en la realización de pruebas serológicas y el tratamiento presuntivo con ivermectina no son adecuados para países endémicos de bajos recursos económicos<sup>46</sup>. En la Figura 16 se muestra la estrategia sugerida.

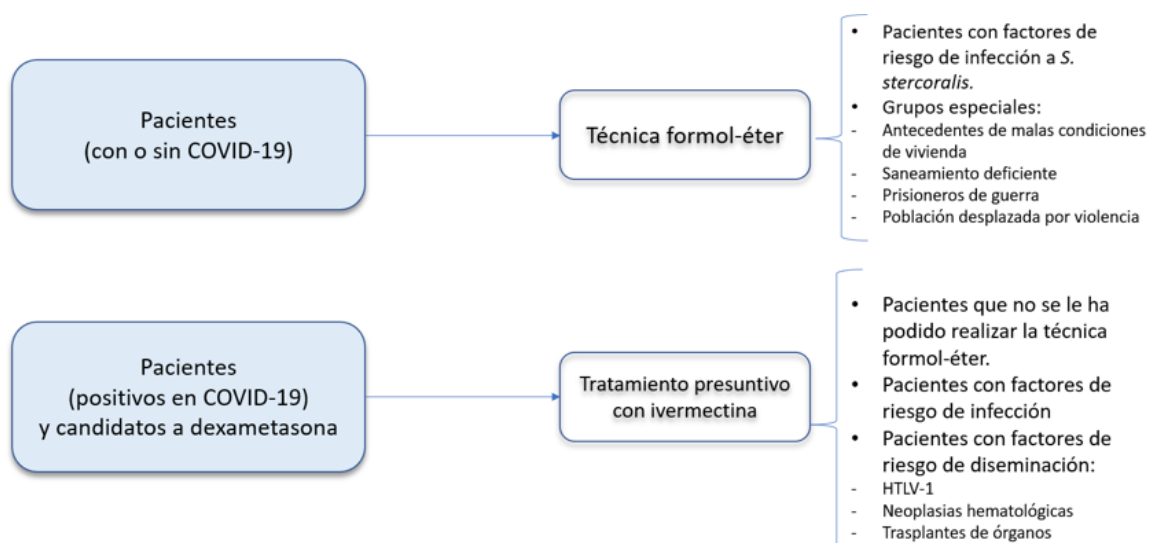


Figura 15. Estrategia de cribado de Olivera<sup>46</sup> (Fuente: producción propia).

## 5.6. COINFECCIÓN EN INMIGRANTES

El estudio de Lorenzo *et al.*, muestra que el 8,14% de los inmigrantes que son positivos en COVID-19, presentan estrongiloidiasis en Salamanca. Según este estudio se debe de realizar una estratificación epidemiológica en función del país de nacimiento, el país de residencia actual y los viajes de larga duración para prevenir el riesgo de hiperinfestación<sup>27</sup>.

El estudio de Jenks *et al.* es un estudio retrospectivo realizado en un centro de salud de New York. Se realizó una investigación acerca de la importancia de la aparición de SH en inmigrantes tratados por corticoides. De 6.412 pacientes que acudieron ambulatoriamente por COVID-19, 68 (1%) pacientes presentaban eosinofilia y 19 (0,3%) fueron positivos a *S. stercoralis*<sup>29</sup>.

## 6 DISCUSIÓN

Recientemente ha aumentado la inquietud por la posible reactivación de una infección crónica por *S. stercoralis* con el uso de terapias inmunosupresoras<sup>3</sup>.

La prevalencia observada de SH varía mucho dependiendo de los estudios publicados, esto puede deberse a que no se haya establecido un protocolo de cribado que iguale las condiciones de diagnóstico. Sin embargo, sí que se observa que entre un 85-100% de los pacientes que acaban con un cuadro de hiperinfestación masiva llevaban una terapia inmunosupresora para la COVID-19<sup>7,39,41</sup>. No se observa diferencia, en relación con la terapia inmunosupresora administrada.

En general, el uso de dexametasona es seguro cuando se usa a bajas dosis y durante cortos periodos de tiempo<sup>27</sup>, pero la inmunosupresión severa que se causa en los pacientes, potencia el riesgo de la aparición de otras infecciones<sup>24</sup>. Riesgo que no se tuvo en cuenta al tratar a pacientes infectados con *S. stercoralis* sin diagnosticar y tratar<sup>29</sup>. Esta potenciación puede deberse a la supresión del sistema inmune o a la presencia de metabolitos de los corticoides que imitan a la ecdisona, cuya función es estimular el ciclo biológico del parásito<sup>47</sup>.

“*Se observa que la edad media aumenta en los casos de SH con respecto a los casos coinfectados en dos estudios, mientras que uno disminuye. Esto puede deberse a que, al aumentar la edad, se debilita la actuación del sistema inmune, aumentando así el riesgo de diseminación*<sup>7,39,41</sup>.”

En cuanto a las características de la población, de manera general el perfil de paciente coinfectado son hombres con una edad media de 58,9 años. Se observa que la edad media aumenta en los casos de SH con respecto a los casos coinfectados en dos estudios, mientras que uno disminuye. Esto puede deberse a que, al aumentar la edad, se debilita la actuación del sistema inmune, aumentando así el riesgo de diseminación<sup>7,39,41</sup>. El estudio de Barroso *et al.*, realizado en España, indica que una edad promedio alta puede deberse a infestaciones que se produjeron en la postguerra<sup>8</sup>.

Además, con relación al género, se observa una mayor proporción de hombres en 3 de 4 estudios<sup>7,27,39,41</sup>. Es posible que se deba a que tradicionalmente los hombres se han ocupado a profesiones como la agricultura y debido al ciclo de vida del parásito, tienen mayor probabilidad de infestación<sup>8</sup>.

Realizar un diagnóstico diferencial de estrongiloidiasis se puede complicar debido a las similitudes de la sintomatología de un cuadro de hiperinfestación y un caso grave de COVID-19. Hay autores que indican que la presencia de eosinofilia es un buen indicador de estrongiloidosis crónica, sin embargo, ante una infección por COVID-19 se produce eosinopenia, por lo que la sensibilidad de la eosinofilia como marcador se vería reducida<sup>41</sup>. En los casos clínicos, se observan que el 62,5% de los pacientes presentan eosinofilia<sup>30-40</sup>.

Como consecuencia de la hiperinfestación, la larva durante la migración puede producir bacteriemia y meningitis por bacterias Gram negativas entéricas, produciendo altas tasas de mortalidad<sup>48</sup>. Se observan en los casos clínicos 3 pacientes que tienen infección secundaria por Gram negativos (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*)<sup>30,35,39</sup>.

Para realizar el diagnóstico, la prueba más utilizada es la serología, seguida del examen microscópico de heces<sup>7,39,41</sup>. Como ya se ha mencionado anteriormente, no todos los países cuentan con los recursos económicos para realizar una serología y, además, esta prueba tiene reacción cruzada con otros geohelminintos<sup>44</sup>. En cuanto al examen de heces, los estudios recomiendan, por una parte, la utilización de técnicas de concentración (técnica de formol-éter o Ritchie modificado). Y, por otra parte, la recogida de heces en días alternos ya que la hembra adulta libera las larvas de forma intermitente<sup>46</sup>.

“ Como consecuencia de la hiperinfestación, la larva durante la migración puede producir bacteriemia y meningitis por bacterias Gram negativas entéricas, produciendo altas tasas de mortalidad<sup>48</sup>. ”

La ivermectina es el tratamiento de referencia para la estrongiloidosis, siendo suficiente una única dosis de 200 µg/kg en estrongiloidosis no complicadas. En casos de infestación diseminada o SH, se aconseja la posología de 200µg/kg/día hasta que se resuelva el caso y la combinación con albendazol<sup>41,42</sup>.

La migración es un factor importante a tener en cuenta a la hora de comenzar una terapia inmunosupresora en un paciente. Jenks et al. recalcan la importancia de un buen cribado en aquellos inmigrantes que vayan a recibir corticoides y no hayan pasado por pruebas de detección al entrar en el sistema sanitario<sup>29</sup>. Por lo tanto, es importante tener en cuenta si el país de procedencia es zona endémica para *Strongiloides* sp. o no<sup>46</sup>.

En cuanto a la situación en España, se observa un bajo porcentaje de centros con protocolo de cribado y, además, durante la pandemia, la ivermectina no estaba disponible en la mayoría de los centros médicos, complicando el diagnóstico y la rápida actuación por parte de los sanitarios<sup>3</sup>.

Finalmente, se observa la necesidad de establecer y validar un protocolo de cribado que unifique la forma de actuar ante estos casos. Sin embargo, como indican Olivera *et al.*,<sup>46</sup> las estrategias que se llevan a cabo en países de altos ingresos no se pueden aplicar en países endémicos de bajos recursos.

## 7 CONCLUSIONES

Tras la realización de esta revisión sistemática se han podido establecer, de acuerdo con los objetivos fijados, las siguientes conclusiones:

- La prevalencia global de la coinfección por *Strongyloides stercoralis* y SARS-CoV-2 no está determinada. La mayoría de los casos detectados son individuos procedentes de zonas endémicas.
- Los síntomas más prevalentes de la coinfección son fiebre, dolor abdominal y eosinofilia.
- La terapia inmunosupresora para tratar la infección por SARS-CoV-2 aumenta la aparición de formas graves en paciente coinfectados con *Strongyloides stercoralis*.
- No se observa diferencias en la reactivación de *Strongyloides stercoralis* en función del tratamiento inmunosupresor utilizado.
- Los métodos diagnósticos disponibles presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad. Se hace, por ello necesario el desarrollo de una prueba que permita mejorarlos.
- La ivermectina consiguió remitir la mayoría de los casos de hiperinfestación de *Strongyloides stercoralis* y SARS-CoV-2.
- Se ha detectado la necesidad de unificar los protocolos de cribado para los casos de reactivación de la infección por *Strongyloides stercoralis* que han sido sometidos a tratamientos con inmunosupresores.

## 8 REFERENCIAS

1. WHO (World Health Organization). Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas [Internet]. [cited 2023 Mar 13]. Available from: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/soil-transmitted-helminthiasis/strongyloidiasis>
2. WHO (World Health Organization). Enfermedades Tropicales Desatendidas [Internet]. [cited 2023 Feb 20]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>
3. Rodríguez-Guardado A, Álvarez-Martínez MJ, Flores MD, Sulleiro E, Torrús-Tendero D, Velasco M, et al. Screening for strongyloidiasis in Spain in the context of the SARS-CoV-2 pandemic: Results of a survey on diagnosis and treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2022;
4. Czeresnia JM, Weiss LM. *Strongyloides stercoralis*. *Lung*. 2022 Apr 1;200(2):141–8.
5. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. Vol. 25, *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2012. p. 458–63.
6. Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, et al. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. Vol. 8, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2014.
7. Pereira CVM, Mastandrea GRA, Medeiros ACC de S, Gryscek RCB, de Paula FM, Corral MA. Covid-19 and strongyloidiasis: What to expect from this coinfection? Vol. 76, *Clinics*. UNIV SAOPAULO; 2021.
8. Barroso M, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Bosch-Nicolau P, Molina I. *Strongyloides stercoralis* infection: A systematic review of endemic cases in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Mar 1;13(3).
9. Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7).
10. CDC. CDC - DPDx - Strongyloidiasis [Internet]. [cited 2023 Feb 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>
11. Campo Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona Arias J, Laura Francisca Campo Polanco C. Revisión sistemática y metanálisis infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). Vol. 88, *Rev Esp Salud Pública*. 2014.
12. Clark TN, Gilman RH. Hookworm and *Strongyloides* Infections. In: *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. 2019. p. 845–90.
13. Belhassen-García M, Fernández Rivas G, Merino Amador P, Rodríguez Guardado A, Salvador F. Documento de revisión de strongyloidiasis GEPI-SEIMC.
14. Puerta-Peña M, Calleja Algarra A. Larva Currens in *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2022 Apr 21;386(16):1559–1559.
15. Arifin N, Hanafiah KM, Ahmad H, Noordin R. Serodiagnosis and early detection of *Strongyloides stercoralis* infection. Vol. 52, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Elsevier Ltd; 2019. p. 371–8.
16. Kishimoto K, Hokama A, Hirata T, Ihama Y, Nakamoto M, Kinjo N, et al. Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar 21;14(11):1768–73.
17. Salvador F, Treviño B, Chamorro-Tojeiro S, Sánchez-Montalvá A, Herrero-Martínez JM, Rodríguez-Guardado A, et al. Imported strongyloidiasis: Data from 1245 cases registered in the +REDIVI Spanish collaborative network (2009-2017). *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May 1;13(5).
18. Pérez JL, Carranza C, Mateos F. Antiparasitarios. Revisión de los fármacos útiles en el tratamiento de parasitosis clásicas y emergentes. Vol. 22, *Rev Esp Quimioter*. 2009.
19. Cooper PJ, Nutman TB. Ivermectin. In: Edward T. Ryan, editor. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. 10th ed. Elsevier; 2019. p. 1155–6.
20. Mensa J, Soriano A, López-Suñé E, Llinares P, Barberán J, Zboromyska Y. Guía de terapéutica antimicrobiana 2022. 32nd ed. ANTARES; 2022.
21. Ficha técnica. [Internet]. Available from: <https://cima.aemps.es/cima/publico/detalle.html?nregistro=85728>
22. Bloom AK, Ryan ET. Albendazole. In: *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. 2019. p. 1141–3.
23. Farthing M, Fedail S, Savioli L, Bundy DAP, Krabshuis JH. Manejo de la Strongyloidiasis.

24. Abdoli A, Falahi S, Kenarkoohi A. COVID-19-associated opportunistic infections: a snapshot on the current reports. Vol. 22, *Clinical and Experimental Medicine*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 327–46.
25. Pascual Pareja JF, García-Caballero R, Soler Rangel L, Vázquez-Ronda MA, Roa Franco S, Navarro Jiménez G, et al. Effectiveness of glucocorticoids in patients hospitalized for severe SARS-CoV-2 pneumonia. *Med Clin (Barc)*. 2021 Mar 12;156(5):221–8.
26. Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 29];8:693–704. Available from: [www.recoverytrial.net](http://www.recoverytrial.net).
27. Lorenzo H, Carbonell C, Vicente Santiago MB, López-Bernus A, Pendones Ulerio J, Muñoz Bellido JL, et al. Influence of the drugs used in migrant patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and the development of symptomatic strongyloidiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2022 May 1;116(5):440–5.
28. Zamarrón E, Carpio C, Villamañán E, Álvarez-Sala R, Borobia AM, Gómez-Carrera L, et al. Impact of systemic corticosteroids on hospital length of stay among patients with COVID-19. *Farmacia Hospitalaria*. 2023 Mar 1;
29. Jenks NP, Driscoll B, Locke T. Strongyloidiasis Hyperinfection Syndrome in COVID-19 Positive Migrants Treated with Corticosteroids. *J Immigr Minor Health*. 2022 Dec 1;24(6):1431–4.
30. Lier AJ, Tuan JJ, Davis MW, Paulson N, McManus D, Campbell S, et al. Case report: Disseminated strongyloidiasis in a patient with COVID-19. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020 Oct 1;103(4):1590–2.
31. Marchese V, Crosato V, Gulletta M, Castelnovo F, Cristini G, Matteelli A, et al. *Strongyloides* infection manifested during immunosuppressive therapy for SARS-CoV-2 pneumonia. *Infection*. 2021 Jun 1;49(3):539–42.
32. Gautam D, Gupta A, Meher A, Siddiqui F, Singhai A. Corticosteroids in Covid-19 pandemic have the potential to unearth hidden burden of strongyloidiasis. *IDCases*. 2021 Jan 1;25.
33. Nakandakari Gomez MD, Marín Macedo H, Seminario Vilca R. IgA (Henoch Schönlein Purpura) Vasculitis in a Pediatric Patient with COVID-19 and Strongyloidiasis. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*. 2021 Jan 12;21(1):184–90.
34. Núñez-Gómez L, Comeche B, Subirats M. Strongyloidiasis: An important coinfection in the COVID-19 era. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2021 Nov 1;105(5):1134–5.
35. Patel A, Bender W, Gonzalez E, Williamson M. A case of disseminated strongyloidiasis during treatment for covid-19. *Chest*. 2021 Oct;160(4):A278.
36. Stylemans D, Cauwelaert S Van, Haenens AD, Slabbynck H. COVID-19-Associated Eosinopenia in a Patient With Chronic Eosinophilia Due to Chronic Strongyloidiasis [Internet]. 2021. Available from: [www.infectdis.com](http://www.infectdis.com)
37. Alkaabba F, Li H, Ibrahim F. Activating dormant strongyloidiasis secondary to COVID-19 treatment. 2022; Available from: <https://dx.doi.org/10.17352/gjmccr>
38. Feria L, Torrado M, Anton-Vazquez V. Reactivation of *Strongyloides stercoralis* in patients with SARS-CoV-2 pneumonia receiving dexametasona. Vol. 158, *Medicina Clínica*. John Wiley and Sons Ltd; 2022. p. 239–47.
39. Kim J, Sivasubramanian G. *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome among COVID-19 Patients Treated with Corticosteroids. *Emergent Infect Dis*. 2022 Aug 1;28(7):1531–3.
40. Singh S, Singh US. Coinfection with *Strongyloides* and *Ascaris* in a COVID-19-positive male presenting with acute abdomen: A case report. *Future Microbiol*. 2022 Sep 1;17(14):1099–105.
41. Seeger D, Cornejo Cisneros E, Lucar J, Denyer R. *Strongyloides* and COVID-19: Challenges and Opportunities for Future Research. Vol. 8, *Tropical Medicine and Infectious Disease*. MDPI; 2023.
42. Luvira V, Siripoon T, Phiboonbanakit D, Somsri K, Watthanakulpanich D, Dekumyoy P. *Strongyloides stercoralis*: A Neglected but Fatal Parasite. Vol. 7, *Tropical Medicine and Infectious Disease*. MDPI; 2022.
43. Vellere I, Graziani L, Tilli M, Mantella A, Campolmi I, Mencarini J, et al. Strongyloidiasis in the COVID era: a warning for an implementation of the screening protocol. Vol. 49, *Infection*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1065–7.
44. Carnino L, Schwob JM, Gétaz L, Nickel B, Neumayr A, Eperon G. A practical approach to screening for *Strongyloides stercoralis*. *Trop Med Infect Dis*. 2021 Dec 1;6(4).
45. Stauffer WM, Alpern JD, Walker PF. COVID-19 and Dexamethasone: A Potential Strategy to Avoid Steroid-Related *Strongyloides* Hyperinfection. Vol. 324, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2020. p. 623–4.

46. Olivera MJ. Dexamethasone and COVID-19: Strategies in low- And middle-income countries to tackle steroid-related *Strongyloides* hyperinfection. Vol. 104, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2021. p. 1611–2.
47. Herbert DR, Stoltzfus JDC, Rossi HL, Abraham D. Is *Strongyloides stercoralis* hyperinfection induced by glucocorticoids a result of both suppressed host immunity and altered parasite genetics? Mol Biochem Parasitol. 2022 Sep 1;251.
48. Shirley DA, Moonah S. Perspective piece COVID-19 and corticosteroids: unfamiliar but potentially fatal infections that can arise following short-course steroid treatment. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene [Internet]. 2021;104(3):790–3. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2011492842&from=export>

---

Blanca Tristán Escudero  
lacosta@umh.es

**Título de Trabajo de Fin de Grado:** Hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis* tras el uso de inmunosupresores en la terapia frente al SARS-CoV-2.

**Tutores:** Lucrecia Acosta Soto. Fernando Jorge Bornay Llinares.

**Centro de realización/presentación:** Universidad Miguel Hernández de Elche.

**Fecha de lectura:** 15 de junio de 2023.

# *BLASTOCYSTIS SPP.*

## RESUMEN

## ABSTRACT

### 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

- 1.1. ENCUADRE TAXONÓMICO
- 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS SUBTIPOS
- 1.3. MORFOLOGÍA
- 1.4. CICLO BIOLÓGICO Y MECANISMO DE TRANSMISIÓN

### 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1. PAPEL PATÓGENO/COMENSAL
  - 4.1.1 Según morfología
  - 4.1.2 Según presencia o no de coinfección
  - 4.1.3 Según número de parásitos
  - 4.1.4 Según el compromiso inmunitario del paciente

- 4.2. MECANISMO INMUNOMODULADOR (PAPEL COMO COMENSAL)
- 4.3. MECANISMO DE VIRULENCIA E INMUNOPATOGENICIDAD (PAPEL COMO PATÓGENO)
- 4.4. PRESENTACIÓN CLÍNICA/ SINTOMATOLOGÍA
  - 4.4.1 Síndrome del Intestino Irritable
  - 4.4.2 Urticaria
  - 4.4.3 Cáncer
- 4.5. DIAGNÓSTICO
- 4.6. TRATAMIENTO
- 4.7. PROFILAXIS

### 5. CONCLUSIONES

### 6. BIBLIOGRAFÍA

# *BLASTOCYSTIS* SPP.

## Resumen

*Blastocystis* spp. es un parásito protista de distribución mundial que parasita tanto humanos como animales. Puede tener un papel patógeno o comensal, en lo que influyen factores como la cepa o subtipo del que se trate, la forma morfológica, si existe una coinfección, el número de parásitos infectante y el compromiso inmunitario del paciente. Tiene tropismo por el tracto gastrointestinal, por lo que en caso de actuar como patógeno dando lugar a síntomas gastrointestinales típicos u otros más llamativos como el intestino irritable, cáncer o urticaria.

# *BLASTOCYSTIS* SPP.

## Abstract

*Blastocystis* spp. is a protist parasite with a worldwide distribution that parasitizes both humans and animals. It may have a pathogenic or commensal role, which is influenced by factors such as the strain or subtype in question, the morphological form, whether there is a coinfection, the number of infecting parasites and the patient's immune compromise. It has tropism for the gastrointestinal tract, so it acts as a pathogen, giving rise to typical gastrointestinal symptoms or other more striking symptoms such as irritable bowel, cancer or urticaria.

# 1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1.1. ENCUADRE TAXONÓMICO

*Blastocystis* es un ser vivo unicelular, eucariota y de metabolismo anaeróbico. En relación a su taxonomía, los últimos análisis genéticos hechos a nivel de la subunidad pequeña del ARN ribosomal, lo clasifican dentro del reino chromista, infrarreino Halvaria, superfilo Heterokonta y filo Bigyra. (1)

Al poder colonizar el tracto gastrointestinal de tanto el ser humano como de otros animales, su denominación se ha actualizado de *Blastocystis hominis* a *Blastocystis* spp. (2).

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS SUBTIPOS

La infección por *Blastocystis* spp. tiene una notable repercusión sanitaria, ya que a día de hoy es el parásito protista más frecuentemente hallado en los análisis microscópicos fecales. A nivel mundial, existen mil millones de personas colonizadas (3), siendo más frecuente en los países en vías de desarrollo, específicamente aquellos con climas tropicales y subtropicales, donde alcanza una prevalencia de entorno al 30-50% y puede encontrarse incluso en agua tratada y considerada "apta" para el consumo (4), mientras que ésta es del 1,5-10% en países desarrollados. En cuanto a su prevalencia en la población infantil, la infección por *Blastocystis* spp. es una de las parasitosis más frecuentes en Europa (5).

Para determinar el subtipo de *Blastocystis*, también acudimos a la secuenciación del ARN ribosómico. Para considerar un nuevo subtipo, se necesita poder demostrar una variabilidad de más de un 5% en el ADN con los demás subtipos identificados (6). Así, a día de hoy, se identifican diecisiete subtipos, ocho de los cuales (ST1-ST8) colonizan a humanos y animales, un subtipo infecta exclusivamente a humanos (ST9) y los restantes (ST10-ST17), únicamente en animales.

Por lo tanto, cabría destacar que únicamente podrían causar infección y sintomatología en humanos los subtipos ST1-ST9, en todo caso.

A nivel europeo, los subtipos más prevalentes son el ST1, ST2, ST3 y ST4, los cuales suman más del 90% de todos los casos registrados (7).

Tanto a nivel mundial como europeo, el más prevalente es el ST3 (8). A nivel europeo, estaría seguido del ST4, el cual, cabe destacar que se sitúa como el subtipo principal en algunos países europeos como España y Alemania y cuya prevalencia se espera que acabe aumentando, posiblemente sustituyendo al ST3 en prevalencia.

Por otro lado, si nos centramos en los países en vías de desarrollo en los que existe un clima tropical, como puede ser en Sudamérica y África, el principal subtipo es el ST1, el cual también destaca por un mayor carácter zoonótico.

## 1.3. MORFOLOGÍA

*Blastocystis* spp posee muchas estructuras celulares comunes con las células humanas, así como una mitocondria con doble membrana y ADN circular, la cual se piensa que tiene un papel fundamental en el metabolismo energético del parásito.

Al igual que muchos parásitos, *Blastocystis* presenta diferentes morfologías según la etapa del ciclo vital en la que se encuentre, cada una de las cuales con características y tamaño diferente:

1. Vacuolar (Fig 1, a): cuando adopta esta conformación, *Blastocystis* presenta una gran vacuola central con componentes de reserva, como lípidos, carbohidratos y otros componentes implicados en la replicación celular. Esta vacuola desplaza el núcleo y otros componentes intracelulares hacia la periferia de la célula. El diámetro medio de esta forma oscila entre 2 y 200 micrómetros, aunque en la mayoría de los casos, los valores medios suelen estar entre 4 y 15 micrómetros. Esta forma puede encontrarse tanto en muestras de heces frescas como en cultivos de laboratorio. Dentro de las formas vacuolares, cabe destacar otras formas similares pero menos visualizadas y estudiadas, principalmente debido a su menor tamaño, como la multivacuolar o la avacuolar, las cuales tienen diámetro medio de entre 5-8 micrómetros (9).

**La forma multivacuolar**, que cuenta con muchas vacuolas en el citoplasma, suele formarse tras la forma vacuolar y como estadio previo a los pre-quistes, principalmente en aquellos que darán lugar a los quistes de pared gruesa.

**La forma avacuolar**, que no presenta vacuolas, también se forma tras la conformación vacuolar y previo a los pre-quistes que darán lugar a quistes tanto de pared fina como gruesa. En el caso de los quistes de pared fina, su formación puede ser antes o después de la forma ameboide, dependiendo de algunas condiciones como la cepa de la que se trate.

2. Ameboide (Fig. 1, c): esta forma supone un estado de transición entre la forma vacuolar y el pre-quiste que, posteriormente, dará lugar a un quiste de pared gruesa. Se caracteriza por la presencia de pseudópodos, estructuras originadas a partir del citoplasma celular que permite un movimiento, aunque lento, y que tienen capacidad de fagocitar y almacenar en el interior celular restos celulares o bacterianos. Tienen un tamaño medio de 10 micrómetros. Se encuentran en heces frescas de pacientes sintomáticos, es decir, en heces diarreicas, así como en cultivos (9).
3. Quística (Fig. 1, d): esta morfología se caracteriza por su pared esférica multilaminar que ejerce un efecto de protección sobre los quistes. Se forman como consecuencia de una esquizogonia del pre-quiste. Al igual que la forma vacuolar, presentan vacuolas con sustancias de reserva y tienen un tamaño de entre 1 y 4 micrómetros (9). Se les suele conocer como quistes fecales dada su localización principalmente en muestras de heces frescas. A su vez, dentro de los quistes, distinguimos dos tipos:

**a. Quistes de pared gruesa.** Estos quistes se forman tras la esquizogonia de un pre-quiste originario de la forma ameboide. Son expulsados al exterior vía fecal y serán los responsables de la infección por *Blastocystis* en caso de ser ingeridos. Tienen una supervivencia de alrededor de un mes a una temperatura de 25°C pero puede aumentar hasta dos meses a temperaturas más bajas de en torno a 4°C. Son sensibles y, por tanto, pueden eliminarse usando desinfectantes o sometiéndolos a temperaturas extremas.

**b. Quiste de pared fina:** Estos quistes se forman tras la esquizogonia de un pre-quiste originario de la forma multivacuolar. No se liberan a través de las heces por lo que no salen al medio exterior ni son causantes de la propagación de la infección a otras personas. Sin embargo, sí que se liberan en el propio intestino grueso de los pacientes infectados.

4. Granular (Fig 1, b): esta forma solo aparece en presencia de algunos estímulos como la presencia de antibióticos o sueros incorporados en medios de cultivo. Su característica fundamental es la presencia de granulaciones con funciones metabólicas y reproductivas, las cuales pueden encontrarse libres en el citoplasma o en el interior de una vacuola central. Tiene un diámetro de entre 2 a 200 micrómetros de diámetro y suele encontrarse en ciertos medios específicos que presenten dichos estímulos que fomentan su crecimiento, como es el caso del medio Boeck-Drbohlav, que suele contener suero fetal bovino como fuente de nutrientes (9).

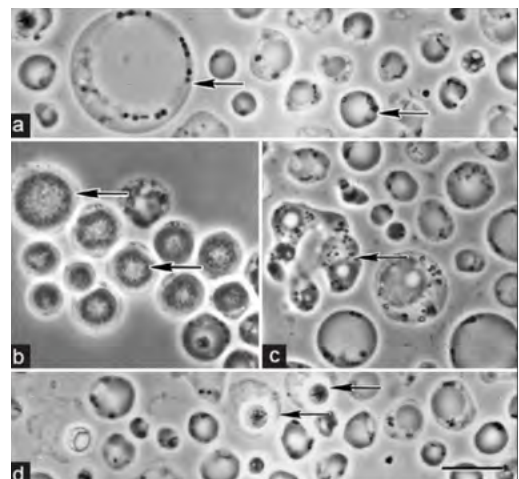


Figura 1. Morfología de *Blastocystis*. (6)

## 1.4. CICLO BIOLÓGICO Y MECANISMO DE TRANSMISIÓN

Al tener contacto por vía oral con la forma infectante, es decir, con los quistes de pared gruesa, debido a una mala higiene o a la contaminación de alimentos o agua, ya que la vía de transmisión es fecal-oral, dichos quistes llegan al tracto digestivo. Al pasar por el estómago, la acción de los jugos gástricos hace que pierdan su pared multilaminar y, cuando alcanzan el intestino grueso, tiene lugar el desenquistamiento, pasando a adoptar una conformación vacuolar, las cuales se dividirán por fisión binaria (10). En este caso, pueden seguir dos rutas (Fig. 2):

- A. Diferenciarse en formas multivacuolares, las cuales formarán un pre-quiste que se dividirá por esquizogonia, dando lugar a un quiste de pared fina, que acabará desenquistándose a nivel del intestino grueso del paciente y dará lugar a formas vacuolares, que harán que se perpetúe el ciclo infeccioso de *Blastocystis* y la sintomatología, en caso de padecerla.
- B. Diferenciarse en formas ameboides, las cuales evolucionarán a pre-quistes que, después de una esquizogonia, darán lugar a quistes de pared gruesa que se expulsarán por vía exógena a través de las heces y, mediante infección fecal-oral, producirán la infección de otras personas (10).

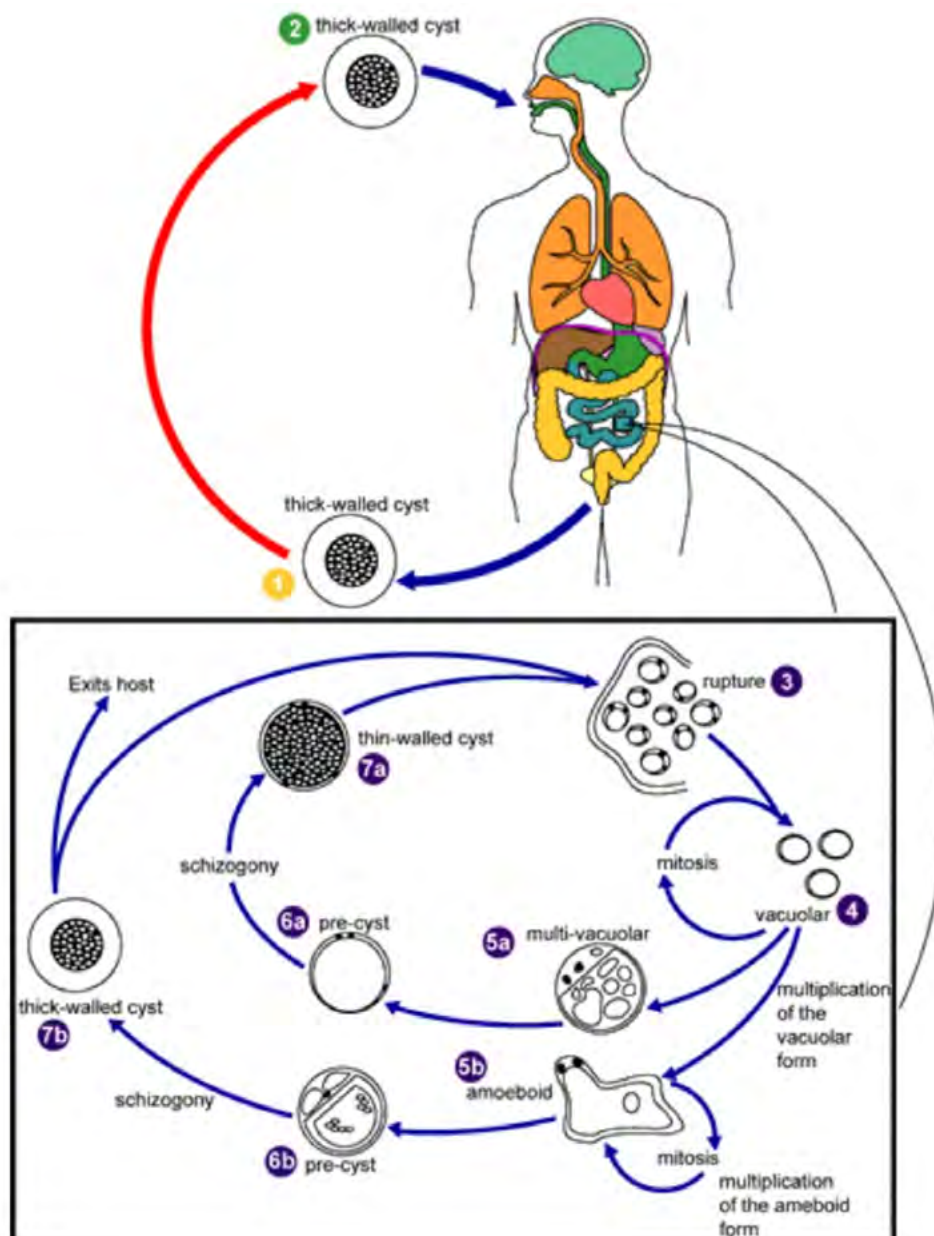


Figura 2. Ciclo biológico de *Blastocystis* spp. (11)

## 2 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es realizar una investigación a través de una revisión bibliográfica de la información publicada y vigente sobre *Blastocystis* spp. para profundizar sobre sus funciones y mecanismos patógenos y comensales, así como los factores implicados en la prevalencia de uno u otro, la sintomatología que produce, su diagnóstico, tratamiento y profilaxis.

## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la revisión bibliográfica se han seleccionado libros y documentos generales sobre Parasitología y más específicos sobre *Blastocystis* en los que se hacía hincapié en los puntos de interés a investigar, así como fuentes bibliográficas de diferentes bases de datos, tanto primarias, secundarias como terciarias, como pueden ser PubMed, MedLine o Scielo.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PAPEL PATÓGENO/COMENSAL:

#### 4.1.1. Según morfología

A pesar de que la forma multivacuolar es la causante de la formación de los quistes de pared fina y de la autoinfección al desmenuzarse a nivel intestinal, la forma amebode, causante de la infección exógena, presenta una membrana externa irregular, que permite una gran adherencia al epitelio intestinal. Así, se ve incrementada la liberación de proteasas por el epitelio intestinal y exacerbando la sintomatología del paciente.

Este hecho se comprueba a nivel de las muestras de heces recolectadas, ya que en las heces de pacientes sintomáticos se encuentra una mayor cantidad de formas ameboides en comparación con las heces de los pacientes asintomáticos, en las cuales hay una mayor presencia de formas vacuolares.

#### 4.1.2. Según presencia o no de coinfección

*Blastocystis* spp. suele encontrarse asociado a otros agentes infecciosos con los que comparte la vía de transmisión, como parásitos, bacterias, hongos o virus. Dentro de los parásitos más frecuentes causantes de coinfección encontramos *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Sin embargo, la asociación más dañina y que mayor modulación provoca en *Blastocystis* suele ser con bacterias o virus, aumentando en mayor medida la gravedad de la sintomatología (11).

#### 4.1.3. Según número de parásitos

La patogenicidad de *Blastocystis* spp. depende en gran medida del número de parásitos presentes en el tracto intestinal. Así, un número de parásitos superior a 5 por campo microscópico en aceite de inmersión, es decir, a un campo de 100x, se consideraría patógeno y causante de sintomatología (12).

#### 4.1.4. Según el compromiso inmunitario del paciente

Existen numerosos factores que influyen sobre el compromiso inmunitario del paciente y, por lo tanto, su respuesta y sintomatología a todo tipo de infecciones, así como el hecho de que, en caso de que exista una infección por *Blastocystis* spp., éste acabe actuando como patógeno o comensal. Entre dichos factores influyen la edad, el estado emocional y estrés del paciente, el tabaco, la dieta, la toma de antibióticos y probióticos y la presencia de otras infecciones gastrointestinales (10). Mención aparte merece el caso de pacientes inmunosuprimidos como es el caso de aquellos con infección por VIH o SIDA, trasplantados, hemodializados, con tratamiento crónico de corticoides o con cáncer (13).

## 4.2. MECANISMO INMUNOMODULADOR (PAPEL COMO COMENSAL)

El papel comensal de *Blastocystis* spp., con el que aprovecha como medio vital el tracto gastrointestinal de diferentes especies, entre ellas la especie humana, está plenamente demostrado ya que, en la mayoría de los pacientes con una función inmunitaria normal, se da una colonización completamente asintomática, es decir, produciendo un beneficio para el parásito, al aprovecharse de un medio idóneo para desarrollarse y multiplicarse, pero sin causar perjuicio en el hospedador (13). En muchos casos, la asociación que se produce es permanente, es decir, hasta que dure la vida tanto del parásito como del hospedador.

Es más, múltiples estudios sugieren además la existencia de una relación mutualista, en la que el ser humano también saldría beneficiado, en base a los siguientes puntos:

- *Blastocystis* spp. pasa a formar parte de la microflora intestinal del ser humano, promoviendo la diversidad de la microbiota, mejorando la salud intestinal (14) y, por otra parte, ejerciendo efectos beneficiosos como la descomposición de celulosa de los alimentos, mejorando la digestión y absorción de los alimentos ingeridos.
- *Blastocystis* spp. podría ejercer un efecto competidor con otros microorganismos causantes de colonización intestinal con un claro efecto patógeno, como *Bacteroides* spp., *Escherichia* spp. y *Shigella* spp. (14), protegiendo así al hospedador de dichas infecciones.
- Estimulando la secreción de citoquinas, como la IL-22, la cual estimula producción de moco a nivel del tracto gastrointestinal, lo que disminuye la irritación y permite evitar o aliviar los síntomas de patologías como la colitis o el síndrome del intestino irritable (SII) (10).
- Estimulando citoquinas que mitigan la inflamación a nivel de la mucosa intestinal, al fomentar la respuesta inmune Th2 y, subsecuentemente, la producción y secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, e incrementando el número de linfocitos T que aumentan la producción de IL-10 (14). Este hecho permite respaldar la relación causal de una exposición humana a *Blastocystis* spp. en la infancia y una menor incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias a lo largo de la vida, como la urticaria o el SII.

“

*Blastocystis* spp. pasa a formar parte de la microflora intestinal del ser humano, promoviendo la diversidad de la microbiota, mejorando la salud intestinal

”

### 4.3. MECANISMO DE VIRULENCIA E INMUNOPATOGENICIDAD (PAPEL COMO PATÓGENO)

Al ser la forma amebode de la morfología la más virulenta, nos centraremos en su mecanismo de virulencia:

Al adherirse al epitelio gastrointestinal, gracias a su morfología irregular, se producirá la liberación, por parte del propio epitelio del paciente, de cisteína-proteasas. Dichas moléculas, tienen diferentes funciones:

- Causan la destrucción directa del parásito, descomponiendo sus proteínas de superficie.
- Dan lugar a la degradación de la IgA humana, lo que se traduce en una evasión del sistema inmune por parte del parásito (15).
- Inducen una respuesta inmune e inflamatoria en el hospedador, mediada principalmente por la síntesis y liberación de la citoquina IL-8 (15).

A su vez, la IL-8, desencadena una mayor cascada inflamatoria, dando lugar a los siguientes acontecimientos:

- Se estimula la quimiotaxis de leucocitos como neutrófilos, monocitos y linfocitos, a través de citoquinas, como la IL-1 o el TNF- $\alpha$ , así como la permeabilidad vascular, que permite una mayor extravasación y llegada al sitio de infección de dichas células inmunitarias.
- Se activan los neutrófilos, una vez en el sitio de infección, promoviendo sus funciones de fagocitosis y producción de radicales libres, para que tenga lugar la destrucción de *Blastocystis* spp.

Como consecuencia de esta respuesta inflamatoria local, tiene lugar en muchos casos, una alteración y apoptosis de las células del epitelio intestinal (15). Así, al destruirse dichas células, se ve alterado su rol homeostático y protector a nivel gastrointestinal y se destruye la barrera protectora intestinal, lo que se traduce en un aumento de la permeabilidad, que da lugar a los síntomas característicos de la blastocitosis, como el desequilibrio homeostático y la pérdida de líquidos.

### 4.4. PRESENTACIÓN CLÍNICA/SINTOMATOLOGÍA

En la mayoría de los casos, *Blastocystis* sp. da lugar a una infección asintomática. Sin embargo, en los casos en los que sí exista una infección sintomática, suele causar una sintomatología principalmente gastrointestinal, dado que la colonización tiene lugar en el tracto digestivo. Dichos síntomas incluirían diarrea acuosa, distensión abdominal, meteorismo, flatulencias, dolor abdominal, cólicos, tenesmo, náuseas, pérdida del apetito, anorexia y anemia ferropénica.

Otros síntomas más raros pueden incluir prurito perianal, sangrado rectal, estreñimiento, fatiga y fiebre. Normalmente, nos encontraríamos ante un cuadro autolimitado, en el que, transcurridos unos días o pocas semanas, los síntomas desaparecerían y el hospedador erradicará el parásito. Sin embargo, en algunos casos, el parásito permanecerá en el tracto digestivo del hospedador, provocando síntomas crónicos.

En caso de encontrarnos con un paciente inmunodeprimido o inmunocomprometido es muy posible que dichos síntomas no desaparezcan totalmente y tiendan a la cronicidad.

Mención aparte merecen otros síntomas con mayor repercusión, como el SII, la urticaria o el cáncer, que también se atribuyen a una infección por *Blastocystis* spp.

#### 4.4.1. Síndrome del Intestino Irritable

El **Síndrome del Intestino Irritable (SII)** es una patología causada por diferentes factores, tanto genéticos como ambientales, entre los que podría incluirse la dieta o una infección digestiva, como podría ser la causada por *Blastocystis* spp. Este síndrome suele estar asociado a una alteración de la microbiota intestinal, que repercute en una alteración de la función intestinal y causa sintomatología propia como meteorismo, distensión abdominal, flatulencias dolor abdominal, cólicos y cambios en la frecuencia y consistencia de las deposiciones.

Se ha sugerido que *Blastocystis* spp. puede tener un papel tanto beneficioso como perjudicial en el desarrollo de dicha sintomatología. El papel beneficioso y protector se discutió anteriormente en el apartado del mecanismo inmunomodulador del parásito.

“*Se ha sugerido que **Blastocystis** spp. puede tener un papel tanto beneficioso como perjudicial en el desarrollo de dicha sintomatología. El papel beneficioso y protector se discutió anteriormente en el apartado del mecanismo inmunomodulador del parásito.*”

Por otro lado, el papel perjudicial y la sintomatología de esta enfermedad están relacionados con el aumento de la inflamación, consecuencia de la secreción de proteasas, (16) la destrucción del epitelio intestinal, el aumento de la permeabilidad y la desregulación a nivel de la respuesta inmunitaria intestinal del paciente, lo que también daría lugar a un desequilibrio a nivel de la microbiota.

A día de hoy, no se conoce con certeza que factores específicos pueden influir en el desarrollo o no de esta enfermedad a largo plazo, sin embargo, se cree que la cepa involucrada en la infección podría representar un factor clave en el desarrollo del SII.

#### 4.4.2. Urticaria

En cuanto a la **urticaria**, es probable que sea consecuencia de la respuesta inflamatoria producida a nivel del hospedador, que tiene como consecuencia la liberación de citoquinas proinflamatorias, las cuales pueden estar implicadas en la activación de células del sistema inmunitario como los eosinófilos y los mastocitos, así como en la desgranulación de estos últimos, que daría lugar a la liberación de histamina. Como consecuencia, aumentará la vasodilatación, la permeabilidad vascular y aparecerán las lesiones cutáneas típicas de la urticaria.

Asimismo, más adelante podrían producirse otros procesos que contribuirán a mantener dicha respuesta alérgica, como serían el aumento de radicales libres, entre los que destacan las especies reactivas de oxígeno (ROS), como consecuencia de la inflamación desencadenada a nivel del hospedador, que darían lugar a una peroxidación lipídica a nivel de los lípidos de las membranas celulares (17). Esta peroxidación lipídica causaría un daño celular, que podría traer consigo la liberación de más citoquinas proinflamatorias y el mantenimiento de la respuesta alérgica (17).

Aun así, este síntoma está presente únicamente en un pequeño porcentaje de los individuos que presentan la sintomatología asociada a esa parasitosis, por lo tanto, se cree que dichos procesos inmunes solo ocurran en ciertos individuos susceptibles o ante una infección de algunas cepas concretas de *Blastocystis* spp., siendo las más relacionadas con el desarrollo de esta sintomatología las cepas ST 1 a ST4 (18).

#### 4.4.3. Cáncer

En cuanto, a la relación de la infección por *Blastocystis* spp. y el desarrollo de **cáncer**, principalmente cáncer colorrectal y gástrico, podría ser consecuencia de la degradación de la inmunoglobulina A del hospedador por acción de las cistein-proteasas epiteliales liberadas como consecuencia de dicha infección. La degradación de esta inmunoglobulina disminuiría la respuesta inmune del paciente, lo que podría aumentar la susceptibilidad a otras infecciones digestivas, aumentando así la inflamación crónica, factor clave en el proceso cancerígeno.

Por otra parte, esta reducción en la respuesta inmune, permitiría aumentar la capacidad proliferativa del tumor y la angiogénesis, en caso de ya haberse desarrollado el tumor (19).

## 4.5. DIAGNÓSTICO

Si una persona presenta los síntomas descritos previamente durante un periodo de más de tres días, deberá acudir al médico para realizar un diagnóstico adecuado, el cual es de gran importancia, dada la similitud con otras patologías o infecciones digestivas.

Se pedirá al paciente que recolecte tres muestras de heces de días no consecutivos, dejando un intervalo de 2-3 días entre cada una, y las conserve en refrigeración hasta ser entregadas. Las muestras deben de ser de varios días, así como de días no consecutivos, ya que existe una notable irregularidad en la expulsión de quistes de *Blastocystis* spp. en heces, existiendo una posibilidad de únicamente 50-60% de detección de quistes en una muestra, mientras que ésta llega hasta más del 95% si se analizan tres muestras no consecutivas (20). Por otro lado, es importante que se conserven bajo refrigeración, ya que así conseguimos una adecuada preservación del parásito, así como un mantenimiento de la integridad de las muestras de heces, facilitando el análisis posterior.

“ Para la realización del análisis microscópico, extenderemos sobre un portaobjetos y con la ayuda de un aplicador de madera una porción de la muestra fecal correctamente homogenizada. ”

Se recurrirá primeramente al análisis coprológico directo, el cual se considera el método de elección por su bajo coste y sencillez. Dentro de este tipo de análisis, destacamos varias técnicas, siendo la más utilizada la de la aplicación de solución salina y Lugol.

Para la realización del análisis microscópico, extenderemos sobre un portaobjetos y con la ayuda de un aplicador de madera una porción de la muestra fecal correctamente homogenizada. En primer lugar, aplicaremos unas gotas de solución salina al 0,85% para hidratar y dispersar los componentes de la muestra, permitiendo así una mejor visualización, colocaremos el cubreobjetos y visualizaremos al microscopio. En segundo lugar, tomaremos un portaobjetos, añadiremos una porción muestra de heces y una gota de Lugol, el cual actúa como fijador y ayuda a resaltar ciertas estructuras como las paredes y núcleos (21).

Otra técnica de tinción incluye la aplicación de la tinción tricrómica, compuesta por azul de anilina, fucsina básica y naranja G, la cual tiñe a la vacuola central de un color azul, que puede llegar a presentar tonalidades rojizas (22).

Por otro lado, también contamos con la técnica del azul de metileno. Esta técnica implica adicionar unas gotas de azul de metileno sobre la muestra y esperar unos 5 minutos para que se tiña completamente, enjuagar suavemente con agua para eliminar el exceso de colorante y, posteriormente, montar el portaobjetos y llevar a cabo el examen microscópico (23).

Finalmente, existe otra técnica de análisis coprológico directo, conocida como la técnica de concentración por Formol-Acetato de Etilo (FEA). Esta se basa en la agregación de una solución de formalina al 10% a la muestra fecal, la cual actúa como agente fijador de las estructuras celulares. Seguidamente, pasaremos la muestra fijada por un filtro, eliminando las partículas de gran tamaño, centrifugamos a gran velocidad y decantamos el sobrenadante, quedándonos con el sedimento, en el cual se encontrarán los parásitos concentrados.

Realizamos una segunda fijación con formol y lavamos con acetato de etilo para eliminar grasas y otros restos que podrían dificultar la observación microscópica. Centrifugamos nuevamente y decantamos el sobrenadante. Finalmente, observamos al microscopio (21).

Gracias al examen directo, podemos detectar diferentes formas del parásito como la vacuolar o la quística, así como el número de parásitos presentes por campo de visión, datos de gran relevancia a la hora de establecer el tratamiento para el paciente.

A continuación, se muestran imágenes de muestras de *Blastocystis* spp teñidas con las diferentes tinciones mencionadas:

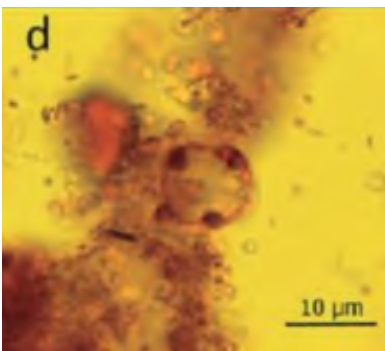


Figura 3. Forma vacuolar de *Blastocystis* spp en tinción de Lugol (24).

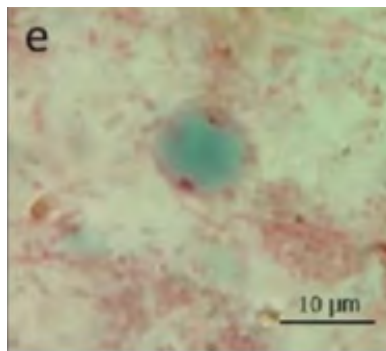


Figura 4. Forma vacuolar de *Blastocystis* spp en tinción tricrómica (24).

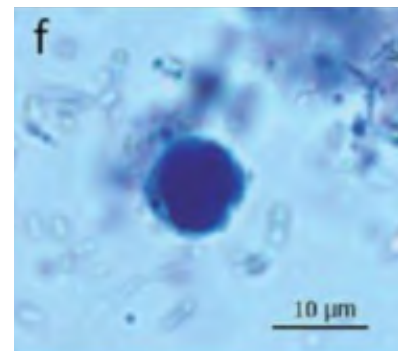


Figura 5. Forma vacuolar de *Blastocystis* spp en tinción de azul de metileno (24).

En segundo lugar, estarían otras formas de diagnóstico como el cultivo, el cual permite detectar la forma granular, además de la vacuolar, que no es detectable por los métodos microscópicos directos, sin embargo, es más costoso, complicado y lleva más tiempo.

Los medios más utilizados suelen ser el medio Jones, Pavlova, Boeck-Drbohlav modificado y Dulbecco modificado. Todos ellos, especialmente el medio Jones, permiten mantener una gran viabilidad del parásito (25).

En tercer lugar, existiría otro método de diagnóstico, como es el diagnóstico inmunológico, con el que detectaremos anticuerpos IgG e IgA específicos de una infección por *Blastocystis* spp. en una muestra de suero sanguíneo del paciente. El diagnóstico inmunológico, se basa principalmente en las técnicas ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI), las cuales se describen a continuación:

ELISA: Se basa en la adición y unión de un primer anticuerpo (suero del paciente) a un antígeno del parásito inmovilizado en una placa de microtitulación. A este primer anticuerpo, se le une un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (anticuerpos específicos de los anticuerpos del suero del paciente). Así, al añadir un sustrato cromogénico, la enzima ejerce su acción catalítica, dando lugar a un producto detectable y medible con el espectrofotómetro.

IFI: Al igual, que la técnica ELISA, se basa en la adición y unión de un primer anticuerpo (suero problema) a un antígeno del parásito. Posteriormente, se le añade un segundo anticuerpo conjugado con un fluorocromo que puede ser visualizado mediante microscopía de fluorescencia. La IFI es más específica y sensible a las formas vacuolares, granulares y ameboides.

Finalmente, podemos recurrir a otros métodos de diagnósticos como son las técnicas moleculares, entre la que destacamos la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) y la posterior secuenciación. En estos casos, haremos uso de una muestra de heces del paciente.

Estas técnicas presentan una gran sensibilidad, reproducibilidad y especificidad, permitiendo conocer el subtipo de *Blastocystis* spp. causante de la infección (3). Sin embargo, cuentan con un coste muy alto y necesitan recursos y personal muy especializado.

## 4.6. TRATAMIENTO

En la mayoría de los casos, la infección suele ser asintomática y, en los casos en los que presenta sintomatología, ésta suele ser autolimitada y cesar por sí sola. Sin embargo, en algunos casos, en los que existe una mayor cronificación de los síntomas, es necesario recurrir a un tratamiento específico. Así, destacamos los siguientes fármacos: metronidazol, nitazoxanida y trimetoprim-sulfametoxazol.

Existen otros fármacos como la paromomicina, el ketoconazol y el yodoquinol, no tan indicados en la práctica clínica, pero que muestran también un efecto antiparasitario por lo que también podrían usarse en la blastocitosis. Todos los fármacos son administrados por vía oral para que ejerzan un efecto a nivel digestivo.

El mecanismo de acción, usos y posología de cada fármaco se detalla a continuación:

El metronidazol es un antiinfeccioso del grupo de los imidazoles y, a parte de usarse para el tratamiento de la infección por *Blastocystis* spp., se usa para el tratamiento de otras infecciones producidas por parásitos como *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* o bacterias como *Clostridium perfringens*. Es considerado el fármaco de elección en caso de sufrir una blastocitosis, ya que presenta un alto porcentaje de eficacia y curación en comparación con otros fármacos (26). Su mecanismo de acción se basa en la penetración y reducción en el interior de la célula del parásito, que tiene como consecuencia la formación de radicales libres que alteran la estructura helicoidal del ADN, así se logra inhibir la síntesis de ácidos nucleicos del parásito, lo que lleva a su muerte. La pauta posológica del metronidazol para adultos sería de entre 250-750 mg/8h o bien de 1500 mg/24h, si decidimos optar por una sola dosis diaria, durante 10 días. En cuanto a la posología en población pediátrica, sería de 15 mg/kg de peso/8 horas durante 5-7 días.

La nitazoxanida es un antiparasitario usado tanto para el tratamiento de la blastocistosis, especialmente en pacientes pediátricos, para los cuáles es muy efectivo, como en el caso de otras parasitosis intestinales como giardiosis y criptosporidiosis. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), clave en el metabolismo anaeróbico de *Blastocystis* spp. Al inhibirse dicha enzima, se interrumpe el metabolismo energético y tiene lugar la muerte del parásito. La pauta que debe administrarse de nitazoxanida en adultos es de 500 mg/12h durante 3 días. En cuanto a la pauta posológica pediátrica, ésta dependerá de la edad: para niños entre 1-3 años será de 100 mg/12 h y para los de 4-11 años, 200 mg/12 h durante 3 días (11).

Los fármacos trimetoprim-sulfametoxazol son una asociación de sulfamidas, que actúa como antibiótico, principalmente usada para el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias y, en algunos casos, como antiparasitario, para el tratamiento de parasitosis como la blastocistosis y la toxoplasmosis. Su acción farmacológica se basa en la inhibición de forma competitiva de la utilización del ácido para-aminobenzoico (PABA) por parte de la enzima dihidropteroato sintetasa, lo que impide la síntesis del ácido fólico, componente necesario para la síntesis de bases de purina y pirimidina, algunos aminoácidos u otras moléculas necesarias para el metabolismo celular. Al inhibir la síntesis de bases de purina y pirimidina, también se inhibe la formación de ácidos nucleicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe los procesos celulares de replicación celular y la síntesis de proteínas y acaba dando lugar a la muerte del parásito. La pauta posológica indicada en una infección por *Blastocystis* spp. para adultos es de 160 mg TMP/800 mg SMX cada 12 horas durante un periodo de entre 7-10 días (27).

La paromomicina es un antibiótico y antiparasitario usado para el tratamiento de infecciones por bacterias gramnegativas como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* y para el tratamiento de parasitosis como blastocistosis y amebiosis intestinales. Su mecanismo de acción se basa en la unión a la subunidad de 30S del ribosoma bacteriano o parasitario, bloqueando así la síntesis de proteínas necesarias para la supervivencia celular.

El ketoconazol es un derivado imidazólico, al igual que el metronidazol, pero su acción es principalmente antifúngica, inhibiendo la síntesis del ergosterol, un componente vital en la membrana celular fúngica. Aun así, se ha utilizado también en el tratamiento de infecciones sintomáticas por *Blastocystis* spp.

Finalmente, el yodoquinol es un fármaco antiparasitario, que actúa inhibiendo el metabolismo parasitario y su síntesis de ADN, provocando la muerte celular. Está principalmente indicado en casos de amebiosis intestinal, aunque también existe documentación de su uso en blastocistosis.

## 4.7. PROFILAXIS

Al tratarse de una infección cuya vía de transmisión es fecal-oral, la educación sanitaria cobra una gran importancia. Es de suma importancia el lavado de manos adecuado, con agua y jabón, o bien, en su defecto, la desinfección con alcohol, especialmente después de ir al baño o previo a la manipulación de cualquier alimento (9).

Asimismo, a la hora de ingerir agua y otras bebidas, deben ser embotelladas para asegurarnos un adecuado tratamiento y desinfección. En caso de no tener acceso a agua embotellada, hervirla. En cuanto a los alimentos consumidos frescos como la fruta y la verdura, deben ser lavados y pelados (9).

En zonas endémicas, deben tomarse medidas adicionales como evitar los cubitos de hielo, lavarse los dientes únicamente con agua embotellada, no nadar en aguas que puedan estar contaminadas y tener precaución a la hora de ducharse, cerrando la boca para evitar ingerir agua. También será recomendable evitar el contacto con animales (28).

## 5 CONCLUSIONES

Se han cumplido ampliamente los objetivos propuestos para el trabajo de investigación, ya que:

En cuanto al estudio del **papel patógeno o comensal** de *Blastocystis* spp., se han identificado diferentes factores que influyen a la hora de su acción como uno u otro. Entre los que fomentan un papel patógeno, destacamos principalmente:

- Su morfología, con la forma ameboide, que cuenta con mayor adhesión al epitelio intestinal y, por lo tanto, mayor respuesta inmune del hospedador.
- La presencia o no de coinfección, presentando un papel patógeno mayor en coinfecciones con otros microorganismos, especialmente virus o bacterias.
- El número de parásitos, resultando en infección sintomática cuando hay más de 5 parásitos por campo 100x.
- El compromiso inmunitario del paciente, presentando una mayor sintomatología y papel patógeno en inmunodeprimidos, infectados por VIH, trasplantados, tratamiento crónico de corticoides o cáncer. También es importante tener en mente otros factores que puedan afectar y disminuir la respuesta inmune, aunque en menor medida, como la edad, estado emocional, el tabaco, dieta, toma de probióticos y prebióticos, e infecciones digestivas (4).

Por otro lado, al estudiar el **mecanismo inmunomodulador** o papel como comensal de *Blastocystis* spp., observamos que su presencia resulta en los siguientes beneficios:

- Una mejora de la digestión de alimentos, especialmente aquellos que contienen celulosa.
- Un efecto competidor con otros microorganismos, evitando infecciones gastrointestinales, que permite un aumento de la producción de moco y, así, promueve la disminución de patologías irritativas como el SII.
- Una disminución de otras patologías autoinmunes e inflamatorias, como la urticaria.

En cuanto a su **mecanismo de virulencia e inmunopatogenicidad**, cuando ejerce un papel patógeno, se debe principalmente a:

- La degradación de la IgA y consecuente disminución de la respuesta inmunitaria del hospedador.
- El aumento de la síntesis y liberación de IL-8 y aumento de la inflamación, lo que da lugar a una reacción inflamatoria en cadena, terminando en la apoptosis de las células intestinales, la destrucción de la barrera intestinal, que lleva consigo el aumento de permeabilidad, y el desequilibrio homeostático y pérdida de líquidos.

Haciendo referencia a la **presentación clínica** del parásito, destacamos una sintomatología típicamente digestiva. Aun así, cabe resaltar otros síntomas desarrollados a largo plazo que se cree que puedan tener relación con una infección por *Blastocystis* spp. Éstos son el SII, probablemente más relacionado con una infección de los subtipos ST1 y ST3, la urticaria, la cual estaría causada por una respuesta alérgica, desencadenada como consecuencia de la inflamación y se daría principalmente en personas sensibilizadas o ante ciertos subtipos del parásito y, finalmente, el cáncer, cuyo desarrollo puede deberse a la supresión de la respuesta inmune por la degradación de la IgA del hospedador, aumentando la proliferación del tumor y la angiogénesis.

Para el **diagnóstico** de esta infección, utilizaremos técnicas coprológicas directas, cultivos, métodos inmunológicos y moleculares. La técnica de primera elección será el diagnóstico coprológico directo, basado en el uso de las tinciones de Lugol, la tinción tricrómica o la técnica de concentración por Formol-Acetato de etilo. Con este método podremos detectar las formas presentes del parásito, especialmente las formas vacuolar y quística y el número de parásitos por campo de visión. En segundo lugar, destacaríamos el diagnóstico por cultivo in vitro con los medios Jones, Pavlova, Boeck-Drbohlav modificado y Dulbecco modificado. En tercer lugar, acudiríamos al diagnóstico inmunológico, basado en las técnicas ELISA y IFI, con las cuales detectaríamos los anticuerpos IgG e IgA específicos de una infección por *Blastocystis* spp. Finalmente, podríamos hacer uso de los métodos de diagnóstico molecular como la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.

El **tratamiento** de los individuos sintomáticos se lleva a cabo si la duración de los síntomas es mayor a lo normal y consiste en el uso principalmente de los fármacos metronidazol, con el que inhibimos la síntesis de ácidos nucleicos de la célula del parásito, nitazoxanida, con el que inhibimos el metabolismo energético del parásito y trimetoprim-sulfametoxazol, con los que inhibimos la síntesis de ácidos nucleicos del parásito.

Finalmente, la **profilaxis** para evitar una infección por *Blastocystis* spp. se basa en una adecuada desinfección y lavado de manos, consumir agua embotellada o hervirla, en su defecto, y lavar y pelar aquellos alimentos frescos como la fruta y verdura. En zonas endémicas, es recomendable evitar el contacto con animales, lavarse los dientes con agua embotellada, no ingerir agua de ducha ni consumir cubitos de hielo.

Algunos factores que podrían haber supuesto una **limitación** en el desarrollo de este trabajo de investigación son la existencia de otros factores y, por lo tanto, mecanismos que influyan en el papel patógeno o comensal del parásito no contemplados, tanto propios del parásito como del paciente, especialmente haciendo referencia al desarrollo de enfermedades como SII y cáncer, las cuales tienen una importante repercusión sanitaria.

**Las nuevas líneas de investigación** sobre la blastocitosis podrían incluir la mayor identificación de los factores de virulencia implicados en el papel patógeno de *Blastocystis*, así como un mayor hincapié en los factores de riesgo personales, especialmente en su relación con los síntomas de SII y cáncer. También puede plantearse la definición y el estudio del modelo animal más adecuado para realización de los estudios de investigación.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Ruggiero MA GDOTBNBTea. A Higher Level Classification of All Living Organisms. [Online].; 2015 [cited 2024 Abril 27. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130114>.
2. SW Tan K. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp. [Online]. [cited 2024 Marzo 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570156/>.
3. Lee O'Brien Andersen CRS. Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective. [Online]. [cited 2024 Abril 2. Available from: doi:10.1128/JCM.02520-15.
4. Achigili Okau Attah ASLILNAINHAHIFHMT. Blastocystis occurrence in water sources worldwide from 2005 to 2022: a review. [Online]. [cited 2024 Marzo 28. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07731-0>.
5. Maria Kantzanou MAKGVaAT. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Children in Europe over the Last Five Years. [Online]. [cited 2024 26 Marzo. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34564544/>.
6. Jeremiah SCPaS. Subhash Chandra Parija and SS Jeremiah. [Online]. [cited 2024 Marzo 20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745665/>.
7. Scanlan P. Blastocystis: past pitfalls and future perspectives. [Internet] Clinicalkey. [Online]. [cited 2024 Marzo 20. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S1471492212000840?returnurl=https%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492212000840%3Fshowall%3Dtrue&referrer=https%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2F>.
8. Vassalos C,MMPSG,VE,PPC,DaVN. Differences in Clinical Significance and Morphologic Features of Blastocystis sp Subtype 3. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/133/2/251/1760991>.
9. Fresnadillo Martínez MJ,GSEyGSJE. Introducción a la protozoología Clínica I. [Online]. [cited 2024 Marzo 21. Available from: <http://ocw.usal.es/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-i/materiales-de-clase/>.
10. Lepczyńska M BJDEPOKKB. how do specific diets and human gut microbiota affect its development and Pathogenicity? [Online]. [cited 20 Marzo 2024. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-017-2965-0>.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Online]. [cited 2024 Marzo 25. Available from: [https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/health_professionals/index.html).
12. Jorge Luis Salinas HVG. Infección por Blastocystis. [Online].; 2007 [cited 2024 Marzo. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292007000300007#:~:text=Algunos%20autores%20han%20sugerido%20que,19%2C%2064%2C%20Sin%20embargo](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292007000300007#:~:text=Algunos%20autores%20han%20sugerido%20que,19%2C%2064%2C%20Sin%20embargo).
13. Hatam AA&ZS&SH&ZA&HEP&MH&VA&G. Association between Blastocystis sp. infection and immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16187-1>.
14. Feranmi F. Blastocystis subtype 4 linked to gut microbiota stability. [Online]. [cited 2024 Marzo 25. Available from: <http://www.thelancet.com/microbe>.
15. Sitara S.R. Ajjampur KSWT. Pathogenic mechanisms in Blastocystis spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. [Online]. [cited 2024 Abril 2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>.
16. Seyed Hasan Abedi a AFbAMcBSdSMeSBATAR. The neglected role of Blastocystis sp. and Giardia lamblia in development of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. [Online]. [cited 2024 Abril 2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105215>.
17. Chandramathi S SKSSMAKU. High levels of oxidative stress in rats infected with Blastocystis hominis. [Online]. [cited 2024 Marzo 20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19961647/>.
18. Abdoli FB&EB&AB&TRR&A. Blastocystis, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. [Online]. [cited 2024 Marzo 27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03793-8>.
19. Taylor-Orozco V,LFA,MMI,HBMaRRK. Blastocystis sp: EVIDENCIAS DE SU ROL PATÓGENO.. [Online]. [cited 2024 Abril 2. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n2/v15n2a07.pdf>.

20. Cañavate C,CJ,MRR,yMRP. El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. [Online]. [cited 2024 Marzo 31. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia35.pdf>.
21. Chacón N,DC,ydIPMA. Blastocystis sp. en humanos: actualización y experiencia clínico- terapéutica. [Online]. [cited 2024 Marzo 31. Available from: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/12/876668/01-chacon-n-5-14.pdf>.
22. Kozubsky LE,yAS. Algunas consideraciones acerca de Blastocystis sp, un parásito controversial.. [Online]. [cited 2024 Abril 2. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572010000300009](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572010000300009).
23. MILAGROS FIGUEROA LARA LMHS. COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS COPROSCÓPICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CROMISTA Blastocystis spp. [Online].; 2017 [cited 2024 Abril 27. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/338710425\\_COMPARACION\\_DE\\_SEIS\\_ME\\_TODOS\\_COPROSCOPICOS\\_PARA\\_EL\\_DIAGNOSTICO\\_DEL\\_CROMISTA\\_Blastocystis\\_spp\\_COMPARISON\\_OF\\_SIX\\_COPROSCOPICS\\_METHODS\\_FOR\\_THE\\_DIAGNOSIS\\_OF\\_THE\\_CHROMISTA\\_Blastocystis\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/338710425_COMPARACION_DE_SEIS_ME_TODOS_COPROSCOPICOS_PARA_EL_DIAGNOSTICO_DEL_CROMISTA_Blastocystis_spp_COMPARISON_OF_SIX_COPROSCOPICS_METHODS_FOR_THE_DIAGNOSIS_OF_THE_CHROMISTA_Blastocystis_spp).
24. Elena Concepción Visciarelli NEBDPVRRDLJIMSCAMRO. Blastocystis: estudio coproparasitológico, clínico-epidemiológico y de prevalencia de subtipo 3 en pacientes de hospitales de Bahía Blanca, Argentina. [Online].; 2021 [cited 2024 Abril 27. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/535/53567968010/html/>.
25. Gallegos L,GA,LUT,GGE,GPL,yAG. Comparación de la eficacia de tres medios de cultivo in vitro para el desarrollo de blastocystis spp. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172013000400010](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000400010).
26. Mirza H WZKFTK. A Metronidazole-Resistant Isolate of Blastocystis spp. Is Susceptible to Nitric Oxide and Downregulates Intestinal Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase by a Novel Parasite Survival Mechanism. [Online]. [cited 2024 Marzo 21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232666/>.
27. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ficha técnica SEPTIN.. [Online]. [cited 2024 Marzo 22. Available from: [https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/48671/48671\\_ft.pdf](https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/48671/48671_ft.pdf).
28. Mayo Clinic. Infección por blastocystis hominis. [Online]. [cited 2024 Marzo 27. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/blastocystis-hominis-infection/symptoms-causes/syc-20351205>.
29. Valeria F. del Cocco NBMJABMAC. Blastocystis spp.: avances, controversias y desafíos futuros. [Online]. [cited 2024 Abril 3. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-blastocystis-spp-avances-controversias-desafios-S0325754116300876>.
30. Méndez Busteloa M dMJMGSSBLELTJ. Blastocystis hominis, un gran desconocido. [Online]. [cited 2024 Marzo 27. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322015000100009](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322015000100009).
31. Scanlan P,SC,RSM,HH,DVPW,OWaCP. The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/90/1/326/2680528>.
32. Salinas JLyVGH. Infección por Blastocystis. [Online]. [cited 2024 Marzo 16. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292007000300007&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292007000300007&lng=es).
33. Puthia M,SS,UaTK. Blastocystis ratti Induces ContactIndependent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489721/>.
34. Ajjampur SaTK. Pathogenic mechanisms in Blastocystis spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. [Online]. [cited 2024 Marzo 18. Available from: <http://www.cmcwtrl.in/publications/Parasitology-International.pdf>.
35. Sekar UaSM. Blastocystis: Consensus of treatment and controversies.. [Online]. [cited 2024 Marzo 24. Available from: <http://www.tropicalparasitology.org/article.asp?issn=2229-5070;year=2013;volume=3;issue=1;spage=35;epage=39;aulast=Sekar>.
36. Guzmán de Rondóna C,VM,GPM,CN,WCaPA. Comportamiento biológico de Blastocystis hominis en pacientes tratados con Secnidazol. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_vm/article/view/522/473](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/view/522/473).
37. Barrios E,CS,GE,OO,AW,yDV. [Online]. [cited 2024 Marzo 29. Available from: <http://pdgbc.bc.uc.edu.ve/bitstream/123456789/1341/1/art04.pdf>.

38. Zapata Valencia JI,ea. Una actualización sobre blastocystis sp. [Online]. [cited 2024 Marzo 20. Available from: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co:8080/bitstream/10893/5935/1/2%20una%20actualizacion.pdf>.
39. Maravilla P,LEE,yMHFB. [Online]. [cited 2024 Marzo 31. Available from: [http://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_1/PDF/blastocistosis.pdf](http://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/blastocistosis.pdf).
40. Fonte L,FA,MYyMY. Pathogenicity of Blastocystis sp. Evidence and mechanisms.. [Online]. [cited 2024 Marzo 31. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602014000300001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602014000300001).
41. Martínez Silva I,AVL,SPO,NFFA,yMGMA. Morbilidad por Blastocystis spp en el Hospital Pediátrico Universitario "William Soler". [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312015000300008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312015000300008).
42. Reyes L,yCM. Blastocystis hominis. Morfología, patología y tratamiento. R. [Online]. [cited 2024 Abril 1. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n2/art8.pdf>.

---

Cecilia Vallejo León  
cecilval@ucm.es

**Título del Trabajo de Fin de Grado:** *Blastocystis* spp.

**Tutor:** María del Carmen Cuéllar del Hoyo.

**Centro de realización/presentación:** Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

**Fecha de lectura:** 8 de Mayo 2024.

Juan Carlos Manzano Ayuso

# MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA CAUSADA POR LA AMEBA "COME-CEREBROS" *NAEGLERIA FOWLERI*

RESUMEN

ABSTRACT

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. ANTECEDENTES

## 2. OBJETIVOS

## 3. METODOLOGÍA

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

4.2. PATOGÉNESIS

4.1.1 Mecanismos contacto-dependientes

4.1.2 Mecanismos contacto-independientes

4.3. SINTOMATOLOGÍA

4.4. DIAGNÓSTICO

4.5. TRATAMIENTO

4.5.1 Tratamiento actual

4.5.2 Nuevos tratamientos

4.6. PROFILAXIS

## 5. CONCLUSIONES

## 6. BIBLIOGRAFÍA

# Meningoencefalitis amebiana primaria causada por la ameba “come-cerebros” *Naegleria fowleri*

## Resumen

La meningoencefalitis amebiana primaria es una afección de rápida evolución y pronóstico desalentador del sistema nervioso central, causada por la ameba parásita *Naegleria fowleri*. Este organismo prolifera especialmente en aguas templadas de todo el mundo, donde es capaz de infectar a humanos que entran en contacto con ella. Los síntomas comienzan entre los 2 y 8 días posteriores a la exposición al parásito. Presentan un cuadro clínico similar a una meningitis bacteriana de muy rápida evolución, que no responde a tratamientos antibióticos habituales. El protocolo de tratamiento actual es anfotericina B, combinada con otros fármacos, pero rara vez tiene éxito y presenta efectos adversos. El avance fulminante y la imprecisión de los síntomas que produce esta encefalitis son la causa de su elevada letalidad. Dada la poca familiaridad de los clínicos con este parásito, debido a su baja incidencia, y hasta que se desarrolle un tratamiento específico eficaz, la prevención es la mejor arma que tenemos contra *Naegleria fowleri*.

# Primary amoebic meningoencephalitis caused by amoeba “brain-eater” *Naegleria fowleri*

KEYWORDS: Primary amoebic meningoencephalitis, *Naegleria fowleri*, parasitic amoeba, amphotericin B, parasitology.

## Abstract

Primary amoebic meningoencephalitis is a rapid developing and often fatal condition of the central nervous system caused by the parasitic amoeba *Naegleria fowleri*. This organism thrives in warm waters all over the world, where it is capable of infecting humans who encounter it. Symptoms appear 2 to 8 days after exposure to the parasite. It develops a bacterial meningitis like illness which doesn't respond to usual antibiotic treatment. The current treatment regime involves amphotericin B, combined with other drugs, but it is seldom successful and causes adverse effects. The fulminating development and vague symptoms of this condition are the main cause of its high lethality. Physician's poor familiarity with the disease, due to its low frequency, and absence of a specific treatment, makes prevention our main asset against *Naegleria fowleri*.

# 1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las amebas de vida libre (AVL) patógenas, llamadas amebas limax, son organismos anfitriónicos<sup>1</sup> pertenecientes al reino protista y de clasificación taxonómica heterogénea (1,2). Esta clasificación está en constante actualización debido a la evolución en la biología molecular, en especial a los avances en la secuenciación genómica de los diferentes géneros y especies descubiertos (2). Bajo el nombre de amebas limax, se reúnen las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata*, y varias especies del género *Acanthamoeba* (1).

La clasificación indicada en la Tabla 1 (3), es más inexacta, pues desobedece la idea que subyace a la sistemática de representar la historia evolutiva de los seres vivos, al emparentar algunos grupos de manera artificial. Pero la clasificación sigue el esquema linneano, por lo que resulta más familiar y manejable a nivel práctico.

<b>DOMINIO</b>	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
<b>REINO</b>	Protozoa	Protozoa	Protozoa	Protozoa
<b>SUBREINO</b>	Eozoa	Sarcomastigota	Sarcomastigota	Sarcomastigota
<b>INFREINO</b>	Excavata	-	-	-
<b>FILO</b>	Percolozoa	Amoebozoa	Amoebozoa	Amoebozoa
<b>SUBFILO</b>	Tetramitida	Lobosa	Lobosa	Lobosa
<b>CLASE</b>	Heterolobosea	Discosea	Discosea	Discosea
<b>SUBCLASE</b>	-	Longamoebida	Longamoebida	Longamoebida
<b>ORDEN</b>	Schyzopirenida	Centramoebida	Centramoebida	Thecamoebida
<b>FAMILIA</b>	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae	Acanthamoebidae	Thecamoebida
<b>GÉNERO</b>	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Balamuthia</i>	<i>Sappinia</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>N. fowleri</i>	<i>A. castellanii</i> *	<i>B. mandrillaris</i>	<i>S. pedata</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las amebas limax (3). \*Se indica *A. castellanii* como representante del resto de especies de *Acanthamoeba*.

“Bajo el nombre de amebas limax, se reúnen las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata*, y varias especies del género *Acanthamoeba*.”

<b>Eukarya</b>	<b>Eukarya</b>	<b>Eukarya</b>	<b>Eukarya</b>
<b>Excavata</b> Cavalier-Smith 2002	<b>Amporphea</b> Adl et al. 2012	<b>Amporphea</b> Adl et al. 2012	<b>Amporphea</b> Adl et al. 2012
<b>Discoba</b> Simpson in Hampl et al. 2009 (R)	<b>Amoebozoa</b> Lühe 1913	<b>Amoebozoa</b> Lühe 1913	<b>Amoebozoa</b> Lühe 1913
<b>Heterolobosea</b> Page & Blanton 1985	<b>Discosea</b> Cavalier-Smith et al. 2004	<b>Discosea</b> Cavalier-Smith et al. 2004	<b>Discosea</b> Cavalier-Smith et al. 2004
<b>Tetramitia</b> Cavalier-Smith 1993	<b>Centramoebida</b> Cavalier-Smith et al. 2016	<b>Centramoebida</b> Cavalier-Smith et al. 2016	<b>Flabellina</b> Smirnov et al. 2005
<b>Eutetramitia</b> Hanousková et al. 2018	<b>Acanthopodida</b> Page 1976	<b>Acanthopodida</b> Page 1976	<b>Thecamoebida</b> Schaeffer 1926
<b>Vahlkampfiidae</b> Jollos 1917 (P)	-	-	-
<b>Naegleria</b>	<b>Acanthamoeba</b>	<b>Balamuthia</b>	<b>Sappinia</b>
<b>N. fowleri</b>	<b>A. castellani</b> *	<b>B. mandrillaris</b>	<b>S. pedata</b>

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de las amebas limax (4).

\*Se indica *A. castellani* como representante del resto de especies de *Acanthamoeba*.

La clasificación indicada en la Tabla 2 (4), es más exacta desde el punto de vista evolutivo, pero solo establece categorías sin nombre que se organizan siguiendo una jerarquía, que no coincide con las categorías habituales utilizadas en clasificaciones linneanas (reinos, filos, clases etc.). En esta clasificación, la autoría de cada taxón se escribe después del mismo. Aquellos taxones sospechosos de ser parafiléticos<sup>2</sup> o polifiléticos<sup>3</sup> se indican con (P).

Los taxones obtenidos por análisis filogenético que no tienen diagnóstico morfológico se indican con (R).

Estos organismos se encuentran como formas de vida libre en su forma de trofozoito, estadio en el que se dividen y alimentan. *Naegleria fowleri* además, es capaz de presentar un estadio de transición ameboflagelado, que facilita su movilidad en situaciones en las que carece de la nutrición necesaria para su supervivencia, con el objetivo de buscar una nueva fuente de alimentación (1,2).

Estas amebas también presentan en su ciclo de vida una forma de resistencia o quiste que puede resistir largos períodos de tiempo en condiciones adversas, como desecación, concentraciones extremas de pH, ambientes anaerobios y/o escasez de alimento (1,2). En la Tabla 3 se incluyen las características morfológicas de los diferentes estadios del ciclo vital de las amebas de vida libre patógenas conocidas hasta la fecha (1,2).

“Estos organismos se encuentran como formas de vida libre en su forma de trofozoito, estadio en el que se dividen y alimentan.”

<sup>2</sup> Grupo que incluye al ancestro común de sus miembros, pero no a todos los descendientes del mismo.

<sup>3</sup> Grupo que no incluye al antepasado común más reciente de todos sus miembros.

Independientemente del estadio en el que se encuentren, las amebas limax son susceptibles de ser inhaladas por aire, agua o polvo que las contengan, así como entrar en contacto directo con la mucosa nasal, ocular o heridas en el tejido cutáneo, causando patología en seres humanos (1,2).

“Independientemente del estadio en el que se encuentren, las amebas limax son susceptibles de ser inhaladas por aire, agua o polvo que las contengan, así como entrar en contacto directo con la mucosa nasal, ocular o heridas en el tejido cutáneo, causando patología en seres humanos (1,2).”

Las amebas limax también pueden ser vehículos de otros agentes etiológicos, capaces de causar infecciones concomitantes, encontrados en aguas, como mimivirus y enterovirus o bacterias como *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium avium*, entre otras (1). De esta manera, las amebas protegen a estos microorganismos de los biocidas ambientales y antibióticos aplicados al hospedador, y también sirven como medio de transporte para colonizar nuevos hábitats aprovechando los mecanismos de dispersión de las AVL (1).

Se localizan en gran diversidad de hábitats y diferentes condiciones meteorológicas, habiéndose encontrado en todos los continentes, excepto la Antártida, y siendo capaces de resistir a altas temperaturas (5).

Los cuadros clínicos causados por las amebas son la meningoencefalitis amebiana primaria (en adelante, MAP), causada exclusivamente por *N. fowleri*; la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), causada principalmente por *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* y *S. pedata* (sin granulomas en este último caso); queratitis amebiana (QA), causada por *Acanthamoeba* spp.; e infecciones nasofaríngeas y cutáneas, causadas por *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* (1).

## 1.1. ANTECEDENTES

Durante la primera mitad del siglo XX, se llamaban amebas de suelos y se consideraban no patógenas (2). En 1958, Culbertson demuestra el potencial patógeno de *Acanthamoeba* (2,6) y en 1965, Malcolm Fowler y Rodney F. Carter reportaron el primer caso de MAP en Australia causada por amebas del género *Naegleria* (7). Por lo tanto, es muy posible que exista una infraestimación de casos totales ocurridos históricamente anteriores a esa fecha, donde el diagnóstico clínico de un cuadro de MAP o encefalitis granulomatosa amebiana pudo ser catalogado, erróneamente, como una encefalitis bacteriana o de etiología desconocida.

Géneros y especies	Trofozoito	Estadio de transición ameboflagelado	Quiste	Reproducción
<i>Naegleria fowleri</i>	15 a 25 $\mu\text{m}$ Locomoción por lobópodos	8 a 20 $\mu\text{m}$ Piriforme con dos o más flagelos	8 a 15 $\mu\text{m}$ Esférico con doble pared y uno o dos poros	Por fisión nuclear (promitosis)
<i>Acanthamoeba</i> <i>A. astronyxis</i> , <i>A. castellanii</i> , <i>A. culbertsoni</i> , <i>A. hatchetti</i> , <i>A. lenticulata</i> , <i>A. palestinensis</i> , <i>A. polyphaga</i> , <i>A. rhyodes</i> , <i>A. lugdunensis</i> , <i>A. royreba</i> , <i>A. quina</i>	20 a 56 $\mu\text{m}$ Locomoción por acantópodos	No existe	11 a 25 $\mu\text{m}$ Esférico con dos membranas (ectoquiste y endoquiste) con poros de unión entre ambas	Por fisión binaria (mitosis típica)
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	12 a 60 $\mu\text{m}$ Forma irregular, limax o de araña con pseudópodos sin ramificaciones	No existe	6 a 30 $\mu\text{m}$ Tres membranas (ectoquiste, mesoquiste y endoquiste) y carece de poros	Por fisión binaria (mitosis típica)
<i>Sappinia pedata</i>	40 a 60 $\mu\text{m}$ con doble núcleo, pseudópodos y película ondulante	No existe	13 a 37 $\mu\text{m}$ Esférico con doble núcleo	Por fisión binaria (mitosis típica)

Tabla 3. Características morfológicas de las amebas limax durante su ciclo vital

## 2 OBJETIVOS

*El objetivo de este trabajo es la descripción del cuadro clínico causado por Naegleria fowleri, denominado meningoencefalitis amebiana primaria, detallando su epidemiología, sintomatología, posible profilaxis, así como su diagnóstico y tratamiento utilizados en la práctica clínica.*

## 3 METODOLOGÍA

La metodología empleada para la realización de este trabajo ha sido fundamentalmente la búsqueda y revisión bibliográfica de artículos científicos relacionados con la materia estudiada, así como la consulta de libros de parasitología, para destacar las características generales de estos organismos. Para obtener estos artículos, se han usado bases de datos como *PubMed* o *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (CEPP), además de buscadores en línea, como Google académico, o consulta de información relevante en *Center for Disease Control and Prevention* (CDC). El criterio de elección de los artículos revisados, han sido la relevancia del tema tratado en el mismo, así como su relativa actualidad, usando aquellos con la información más actualizada disponible.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. EPIDEMIOLOGÍA

La meningoencefalitis amebiana primaria, es una condición de rápida evolución (2 a 8 días) y pronóstico normalmente fatal causado por la ameba *N. fowleri*. Este parásito es conocido coloquialmente como la ameba “come-cerebros”, debido a las características necrotizantes de su actuación en el sistema nervioso que se pueden observar en las muestras de tejido cerebral obtenidas *post-mortem* de los pacientes que han sufrido esta afección.

Esta infección es caracterizada como “primaria” para diferenciarla de otras infecciones causadas por amebas parásitas, que afectan al sistema nervioso central (en adelante, SNC) tras una diseminación previa por el sistema circulatorio (8). El agente causal, *N. fowleri*, recibe su nombre de Malcolm Fowler, clínico del Adelaide Children´s Hospital en Australia, quien describió el primer caso de MAP asociado a este organismo (7). Aunque se conocen 47 especies de *Naegleria* hasta la fecha, solo *N. fowleri* es responsable de causar MAP en humanos (9–11). Esta afección ocurre casi siempre relacionada con actividades acuáticas en agua dulce<sup>4</sup>, como baños en lagos, estanques, aguas termales o piscinas, spas o jacuzzis no tratados correctamente, o al realizar una irrigación de los senos nasales con agua contaminada. También se ha reportado la inhalación de polvo con presencia de quistes en un 6,5% de los casos de MAP (11,12).

Suele ocurrir en los meses de verano, cuando las altas temperaturas permiten que este organismo prospere, y las actividades relacionadas con el agua son más frecuentes (9).

En un estudio publicado en 2020 y realizado durante 2018 (5), se identificaron un total de 381 casos de MAP que ocurrieron entre 1937 y 20165. En la Figura 1 se detalla la distribución mundial de los casos identificados en dicho estudio<sup>6</sup>, donde cabe destacar que los países con una incidencia mayor de esta afección fueron Estados Unidos (41%), Pakistán (11%) y México (9%).

“ Esta infección es caracterizada como “primaria” para diferenciarla de otras infecciones causadas por amebas parásitas, que afectan al sistema nervioso central (en adelante, SNC) tras una diseminación previa por el sistema circulatorio (8). ”

<sup>4</sup> *N. fowleri* no se encuentra en agua salada.

<sup>5</sup> Hay que tener en cuenta una media de 2 años desde que un caso ocurre hasta que es publicado.

<sup>6</sup> No se identificaron casos en los estados americanos de Alaska y Hawái, ni en ninguno de los países del Océano Pacífico no representados en la imagen.



Figura 1. Distribución mundial de los casos de MAP causados por *N. fowleri* (n=381) reportados entre 1937 y 2016 (5)

De estos 381 casos, 182 fueron clasificados como confirmados, porque se detectó *N. fowleri* en el líquido cefalorraquídeo (en adelante, LCR) o tejido cerebral mediante inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia indirecta (IIF), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o secuenciación de nueva generación (NGS); 89 como probables, donde se detectó *N. fowleri* en LCR o tejido cerebral mediante visualización directa o cultivo, sin confirmación diagnóstica molecular disponible y donde el paciente presentó un inicio agudo de meningoencefalitis caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, vómitos y/o meningismos con una exposición a fuentes de agua en los 14 días anteriores; y 110 como sospechosos, donde se detectó *N. fowleri* en LCR o tejido cerebral, igual que en los probables, pero donde la sintomatología y anamnesis no coinciden con un caso típico de MAP. Durante este periodo, el estudio determinó un incremento del 4,5% de casos confirmados cada año. Este dato parece indicar un incremento en las infecciones causadas por *N. fowleri*, según nos acercamos a la fecha actual, aunque también puede ser interpretado como una mejora en los métodos de diagnóstico a lo largo de esos años.

## 4.2. PATOGÉNESIS

Una vez que *N. fowleri* entra en el organismo del hospedador humano, la aparición de la enfermedad suele ser muy rápida, entre dos y 8 días (10), llegando a ocurrir, en algunos casos, en las primeras 24 h tras la exposición.

Su inicio agudo se debe al mecanismo de entrada del parásito, que accede directamente al SNC. El contacto del hospedador con el patógeno comienza, normalmente, durante actividades vinculadas al agua, como baños en lagos, piscinas, entre otros, donde la ameba, en su forma de trofozoito, entra en contacto con las fosas nasales, y permanece aferrada a la mucosa nasal<sup>7</sup>. Además, si las condiciones lo permiten, este parásito es capaz de producir una "infección seca" (6,5 % de los casos de MAP), mediante la inhalación de partículas de polvo que contengan los quistes del patógeno, es decir, no haría falta sumergir la cabeza debajo del agua para ser infectado por este método, transformándose en su forma de trofozoito una vez anclado en la mucosa nasal (11,12). En este punto, es capaz de excavar la lámina cribosa hacia el cerebro, la cual es más porosa en niños y adultos jóvenes, lo cual explica su mayor incidencia en este tipo de pacientes (13), a través de los nervios olfatorios hasta el bulbo olfatorio, donde avanzan al espacio subaracnoideo y llegan a su destino final en el SNC (1,10).

*N. fowleri* causa un daño irreparable en el tejido nervioso, debido a su patogenicidad y a la respuesta inmune intensa que desata. La información que disponemos sobre los mecanismos de virulencia de este parásito es limitada, pero se han desarrollado modelos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo* para entender los mecanismos moleculares asociados con la patogénesis de esta afección (11,14). Hasta ahora, dos mecanismos de patogenicidad han sido atribuidos a *N. fowleri*, expuestos en los apartados siguientes.

#### 4.2.1. Mecanismos contacto-dependientes

Estos mecanismos sugieren que la especie patógena de *Naegleria*, presenta un nivel de anclaje superior a las membranas celulares del hospedador que las especies no patógenas, además de presentar mecanismos de citotoxicidad que dependen del contacto directo del parásito con las células del hospedador (11).

Los estudios *in vitro* realizados, han demostrado que la ameba se une al epitelio nasal a través de componentes de las membranas de este tejido, como la laminina-I, colágeno-I, y fibronectina, gracias a proteínas de adhesión similares a integrina, junto con filamentos de actina y proteínas de unión a fibronectina presentes en la membrana de la ameba (11,14). Además, las quinasas C encontradas en *N. fowleri*, han demostrado aumentar la citotoxicidad y adhesión de la ameba hacia la célula hospedadora.

Otro mecanismo contacto-dependiente sugiere que el contacto directo con la matriz extracelular (MEC) de células nerviosas desencadena una cascada de señalización en el parásito que, en última instancia, desemboca en la expresión de proteínas específicas y proteasas que facilitan la entrada y proliferación de la ameba en el SNC (11). Esta conclusión se obtuvo de un estudio *in vivo*, donde una colonia de *N. fowleri* se ponía en contacto con el cerebro de ratones macho en 6 intervalos mensuales, presentando al final del estudio una virulencia 100 veces superior a otra colonia del mismo parásito cultivada axénicamente, demostrada por la disminución en la dosis infectiva 50 (DI50) de una colonia respecto a la otra (11,15). Ambas colonias eran indistinguibles microscópicamente, sin embargo, la colonia más virulenta que había atravesado el tejido cerebral presentaba proteínas asociadas con la reorganización y estabilización del citoesqueleto, ausentes en la colonia axénica. Concretamente, se detectó una proteína homóloga al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Rho 28, que podría ser útil como diana en la elaboración de fármacos para tratar MAP.

Por último, también presentan un mecanismo de fagocitosis contacto-dependiente. Estos organismos son capaces de fagocitar las células del hospedador por la acción de unas estructuras fagocíticas llamadas amebostomas, cuya función es "morder" e ingerir las células nerviosas (1). Se ha observado que las cepas menos virulentas, ingieren directamente las células del hospedador usando estas estructuras, mientras que las altamente virulentas, lisan las células primero y se alimentan posteriormente de los fragmentos restantes (11). Los genes *Nfa1* y *Nf-actina*, que codifican para las proteínas *Nfa1* y *Nf-actina*, respectivamente, han sido relacionados con la locomoción y los amebostomas que presentan estas amebas. Además, la transferencia de este gen presente en *N. fowleri*, a una especie no patógena de *Naegleria*, como es *N. gurberi*, aumentó su toxicidad respecto a una colonia corriente de *N. gurberi* (16). Estos genes y proteínas también podrían ser una diana objetivo para el desarrollo de fármacos anti-*Naegleria*.

#### 4.2.2. Mecanismos contacto-independientes

Estos mecanismos son principalmente dos: las proteínas formadoras de poros y las enzimas hidrolíticas. *Naegleria fowleri* expresa N-PFP, una proteína de membrana citolítica formadora de poros, la cual despolariza el potencial de membrana afectando a la integridad de las células del hospedador. También presenta otras polipeptidasas formadoras de poros conocidas como *Naegleriaporos A* y *B*. Ambas polipeptidasas tienen propiedades estructurales comparables a las polipeptidasas citolíticas y antimicrobianas de los ameboporos de *Entamoeba histolytica* y de las células NK y los linfocitos T.

En cuanto a las enzimas hidrolíticas, *N. fowleri* expresa fosfolipasas, esfingomielinasas, neuraminidasas y elastasas entre otras, cuya actividad es óptima a pH 7 y 35°C. No se puede confirmar con certeza absoluta que todas las enzimas hidrolíticas que presenta este patógeno influyan en su patogénesis (8,11).

*Naegleria fowleri* produce, además, monóxido de nitrógeno (NO) *in vitro*, lo cual sugiere que este pueda ser otro mecanismo de patogenicidad del parásito.

Por último, cabe mencionar que recientemente se ha identificado una proteína (Nf-cHSP70) contenida en el citoplasma, pseudópodos y estructuras fagocíticas de la ameba. Al inhibir la síntesis de esta proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*), se reduce la proliferación y citotoxicidad de *N. fowleri*, pudiendo ser usada como diana en la investigación de medicamentos contra este patógeno (8,11).

### 4.3. SINTOMATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas son usualmente indistinguibles de aquellas producidas por una meningitis bacteriana o vírica, ya que los pacientes presentan dolores de cabeza, fiebre, náuseas, fatiga, y vómitos. En fases más avanzadas, se pueden presentar otros signos y síntomas, como anorexia, irritación, rigidez de nuca, signo de Kernig, signo de Brudzinski, letargia, fotofobia, confusión, convulsiones y posible coma. Las autopsias han revelado que los hemisferios cerebrales de las personas afectadas con esta condición están blandos, hinchados, edematosos y gravemente congestionados tras la infección. La materia blanca del cerebro y la médula espinal exhiben desmielinización local. Los bulbos olfatorios presentan exudados inflamatorios y hemorragias, mientras que las leptomeninges (aracnoides y pía madre) están congestionadas, difusamente hiperémicas y con infiltración limitada. Los trofozoítos de este parásito, pero no los quistes, han sido identificados en la base del cerebro, hipotálamo, subaracnoideo, y espacios perivasculares (8,11).

### 4.4. DIAGNÓSTICO

Debido a la naturaleza rápida y poco común de esta afección, el diagnóstico suele ocurrir tras la muerte del paciente (*post-mortem*) (9). Los valores de los parámetros típicos medidos en sangre, como el recuento completo de células sanguíneas y marcadores de la función renal y hepática, no suelen ser llamativos. Sin embargo, los marcadores generales de infección, como la tasa de sedimentación eritrocítica o la proteína C-reactiva, siempre están elevados (10).

Las pruebas en muestras de LCR pueden ayudar a descartar la etiología vírica de la afectación al SNC. Normalmente, se realiza una punción lumbar cuando aparecen los síntomas neurológicos y no existen otras contraindicaciones. Los bajos niveles de glucosa y elevada concentración de proteínas en estas muestras suelen excluir la infección viral (10). Una vez tenemos la muestra, se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos con el fin de concentrar los trofozoítos que son muy móviles; posteriormente se procede a colorear con hematoxilina férrica, hematoxilina-eosina, Wright o Giemsa (2). Con ello, se puede realizar una visualización directa de la ameba en las muestras de LCR bajo el microscopio óptico si existe acceso a clínicos expertos en detección de amebas móviles, aunque, en general, se recomienda derivar esta última prueba a laboratorios acreditados, por la alta probabilidad de detectar falsos positivos, debido al gran parecido entre el trofozoito de *Naegleria* con los leucocitos y macrófagos humanos presentes de manera natural en esta muestra (10). Es útil también el cultivo a partir de LCR en Agar No Nutritivo enriquecido con *Escherichia coli* y la demostración de trofozoítos mediante biopsia de tejido cerebral (2).

Además de los métodos microscópicos mencionados, se han desarrollado ensayos moleculares como el de inmunofluorescencia (IF), el ensayo de inmovilización unido a enzimas (ELISA) o PCR, para detectar este patógeno en muestras de LCR (8).

La secuenciación metagenómica de nueva generación (mNGS), es otro método diagnóstico utilizado exitosamente (12); se utilizó en un paciente de 38 años con síntomas de meningitis bacteriana que no presentó mejoría tras el tratamiento con antibióticos. Entonces, una muestra de 2-3 mL de LCR fue enviada al laboratorio Hugobiotech en Beijing donde se utilizaron 200 µL para extraer y purificar el ADN sobre el que se realizó la prueba. El resultado fueron un total de 23.834 secuencias coincidentes con *N. fowleri*. El patógeno fue confirmado posteriormente por PCR. A pesar del correcto diagnóstico por este método, el tiempo que duró el transporte de las muestras al laboratorio fue de dos días, lo que imposibilitó el establecimiento del tratamiento empírico a tiempo, y el paciente falleció un día antes.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el reconocimiento de *N. fowleri* en muestras de tejido cerebral cubierto en parafina, se realizan de manera rutinaria en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) (8).

En resumen, el diagnóstico de MAP debería ser considerado cuando el paciente presenta un establecimiento agudo de fiebre, dolor de cabeza, vómitos u otros síntomas similares a una meningitis bacteriana, con una exposición a fuentes de agua en los 14 días anteriores al establecimiento de los síntomas, y un LCR con ausencia de bacterias o virus. Si no se observan amebas en esta muestra, el LCR debería ser sometido a otras pruebas diagnósticas como ELISA, IFI o PCR para confirmación (8). El uso de esta definición clínica de caso probable generalizada y familiarización de los profesionales sanitarios con la misma, asegura un pronto índice de sospecha durante la consulta médica, permitiendo el comienzo temprano de investigaciones diagnósticas más exhaustivas, que, en última instancia, permitan la instauración de un tratamiento aventajado del paciente, vital para su supervivencia (10).

## 4.5. TRATAMIENTO

### 4.5.1. Tratamiento actual

Hasta hoy, el fármaco más usado en el tratamiento de las infecciones por *Naegleria fowleri* es la anfotericina B, un antifúngico cuyo mecanismo de acción consiste en la producción de canales o poros en la membrana eucariótica, alterando la permeabilidad de la misma y facilitando la salida de componentes esenciales para su funcionamiento. La selectividad de este agente radica en que su unión con el ergosterol de las membranas fúngicas es 500 veces mayor a la del colesterol de las membranas celulares humanas (2,11).

El uso de anfotericina B sola o en combinación con otros fármacos como fluconazol, azitromicina, y rifampina por vía intravenosa o intratecal, ha demostrado cierta eficacia cuando se administró en las fases iniciales de la enfermedad. A pesar de esto, se necesitan buscar nuevas alternativas a este tratamiento, pues se requieren altas concentraciones de estos fármacos para actuar en el SNC debido a su baja penetrabilidad por la barrera hematoencefálica (en adelante, BHE), lo cual produce efectos adversos indeseados como anemia, escalofríos, náuseas, fiebre, vómitos, dolor de cabeza y una importante toxicidad renal (11).

En la Tabla 4, se resumen los tratamientos utilizados en los casos supervivientes conocidos hasta la fecha (5,17–21). Como se puede observar, la anfotericina B fue el único fármaco usado en todos los casos supervivientes conocidos. También parece ser clave la rápida instauración del tratamiento, siendo de un máximo de cinco días desde la aparición de los primeros síntomas.

Ref.	País, Año	Edad (años) / Sexo	Anfotericina B (días)	Azoles (días)	Azitromicina (días)	Miltefosina (días)	Rifampina (días)	Dexametasona (días)	TTS (días)
-	Australia, 1971	14/H	IV (Desc.) IT (Desc.)	-	-	-	-	-	Desc.
-	Estados Unidos, 1978	9/M	IV (9) IT (10)	IV (9) IT (9)	-	-	VO (9)	IV (Desc.)	3
(20)	México, 2003	10/H	IV (14)	IV/VO (30)	-	-	VO (30)	IV (Desc.)	0
(21)	Estados Unidos, 2013	12/M	IV (26) IT (10)	IV (26)	IV (26)	VO (26)	IV (26)	IV (4)	2
(19)	Estados Unidos, 2013	8/H	IV (19) IT (5)	IV (19)	VO (19)	VO (19)	VO (19)	IV (29)	5
(18)	Pakistán, 2015	25/H	IV (Desc.) IT (Desc.)	Desc. (Desc.)	Desc. (Desc.)	VO (Desc.)	IV (Desc.)	-	3
-	Estados Unidos, 2016	16/H	IV (14) IT (10)	IV (28)	IV (28)	VO (28)	IV/VO (28)	IV (4)	2
-	España, 2018	14/M	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.	Desc.
(17)	Pakistán, 2023	22/H	IV (28) IC (Desc.)	IV (28)	IV (28)	VO (28)	VO (28)	-	2

**Tabla 4.** Tratamientos utilizados en los supervivientes confirmados de MAP hasta 2023 (5,17–21).

**Abreviaciones:** Ref, referencias; H, hombre; M, mujer; IV, intravenosa; IT, intratecal; VO, vía oral; Desc, desconocido; TTS, Tiempo en comenzar el Tratamiento desde el comienzo de los Síntomas.

La combinación de la anfotericina B con la azitromicina, parece ser especialmente útil, pues presentan una relación sinérgica mejorando el pronóstico respecto a sus administraciones individuales correspondientes. En cuanto a los azoles, cabe mencionar que el ketoconazol presenta la menor concentración mínima inhibitoria (CMI), aunque esta es inferior a la de la anfotericina B (8).

Otro fármaco usado exitosamente en el tratamiento de MAP es la miltefosina, una alquilfosfolina usada para tratar las lesiones cutáneas malignas en el cáncer de mama en humanos y la leishmaniosis en perros. Su principal utilidad es la facilidad que tiene para atravesar la BHE. Fue usada, exitosamente, por primera vez en 2013, en una niña de 12 años que sobrevivió a la infección con una recuperación neurológica completa (11,21).

Por último, la dexametasona fue usada en cinco de los casos supervivientes, con el objetivo de reducir la inflamación y el edema cerebral que presentaban estos pacientes, lo cual parece ser una estrategia a tener en cuenta para llevar a cabo un tratamiento completo de todos los síntomas que puedan ocasionar la muerte del paciente si no son vigilados y tratados adecuadamente.

#### 4.5.2. Nuevos tratamientos

La información que se dispone sobre los nuevos tratamientos de MAP, es obtenida a través de casos clínicos y diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*, porque, debido a la baja incidencia y rápida evolución de esta condición, la posibilidad de realizar ensayos clínicos, para determinar la seguridad y eficacia de los fármacos candidatos, es muy pequeña. Esta es también la razón por la que no supone un gran incentivo económico para la industria farmacéutica el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar esta enfermedad. El método menos costoso para descubrir nuevos fármacos para MAP es, por tanto, “reutilizar” fármacos existentes que ya presentan otras indicaciones (11).

##### 4.5.2.1. Estudios *in vitro*

Estos estudios han demostrado eficacia de diversos fármacos como posibles tratamientos anti-*Naegleria*, algunos ya comercializados con otras indicaciones y otros descubiertos recientemente.

De aquellos que se conoce su posible mecanismo de acción, existen inhibidores de las proteasas de cisteína, que se mencionaron en el apartado de patogénesis como un importante mecanismo contacto-dependiente de *N. fowleri*.

El fármaco de organoselenio sintético Ebselen y los compuestos fenil-vinílicos relacionados con sulfonas BAY 11-7082 y BAY 11-7085 han sido estudiados y presentan 8,5, 34 y 23 veces más potencia que la miltefosina en la inhibición del crecimiento de *N. fowleri* respectivamente. Otra ventaja de estos compuestos es que atraviesan fácilmente la BHE (11,22). Las estatinas utilizadas en el tratamiento de la hipercolesterolemia como la fluvastatina, atorvastatina, pitavastatina, cerivastatina y rosuvastatina, interfieren en la vía de síntesis del ergosterol y los estudios realizados *in vitro* con estos fármacos, también aportan resultados prometedores (11). Por último, cabe mencionar el inhibidor de farnesil transferasa lonafarnib, que bloquea la producción de ergosterol, y tiene una actividad sinérgica con pitavastatina, produciendo una inhibición del 95% en el crecimiento de trofozoítos de *N. fowleri* (11,23).

En cuanto a los fármacos estudiados *in vitro* cuyos mecanismos de acción para eliminar a *N. fowleri* son desconocidos, vale la pena señalar: la auranofina, un agente antirreumático; el etomoxir y la perhexilina, inhibidores de la oxidación de ácidos grasos; y, la tioridazina y el ácido valproico, agentes antiepilépticos (11).

“ Otra ventaja de estos compuestos es que atraviesan fácilmente la BHE (11,22). ”

Aunque los fármacos descritos previamente hayan demostrado eficacia antiamebiana en estudios *in vitro*, es necesario realizar estudios *in vivo* para descubrir y confirmar su verdadero potencial como fármacos contra MAP (11).

##### 4.5.2.2. Estudios *in vivo*

En los estudios *in vivo* realizados, se comprobaron las tasas de supervivencia de grupos de ratones infectados, tratados con los nuevos fármacos, en comparación con grupos control no tratados y, a veces, con grupos tratados con anfotericina B sola o en combinación con otros fármacos del tratamiento empírico actual. Además, se pudo medir posteriormente, si las dosis administradas causaron efectos adversos en los ratones supervivientes.

El antipsicótico clorpromazina, demostró una tasa de supervivencia del 75% en los ratones infectados, usando dosis de entre 10 y 20 mg/kg, las cuales no produjeron daños renales ni hepáticos en los ratones (24). De los numerosos antibióticos estudiados *in vivo*, la rokitamicina es el que ha demostrado una mayor eficacia para tratar MAP, pues aumentó un 80% la tasa de supervivencia de los ratones infectados usando una dosis de 20 mg/kg, la cual tampoco indujo toxicidad renal ni hepática (25). Pero el fármaco más prometedor, es el macrólido corifungina, que, administrado a una dosis, bien tolerada, de 9 mg/kg en ratones infectados, consiguió una tasa de supervivencia del 100% (26).

#### 4.5.2.3. Conjugación con nanopartículas

Uno de los principales problemas que nos encontramos para tratar enfermedades que afectan al SNC, es la difícil accesibilidad de los fármacos por el complicado paso a través de la BHE, el cual se puede resolver incrementando la dosis administrada, asumiendo entonces, el correspondiente aumento en su toxicidad. Las nanopartículas son una de las soluciones que ha encontrado la industria farmacéutica para este gran problema. Los sistemas de liberación de fármacos que incluyen nanopartículas aumentan la biodisponibilidad, disminuyen la dosis de fármaco necesaria para cumplir su función y actúan en la diana específica para la que están indicados, reduciendo al máximo los efectos adversos del tratamiento. Se han realizado estudios para entender las ventajas del uso de fármacos conjugados con nanopartículas para el tratamiento de MAP y los resultados son muy prometedores (11).

## 4.6. PROFILAXIS

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas son la manera más eficaz de prevenir enfermedades. Por este motivo, un grupo de científicos desarrollaron en 2013 una vacuna de ADN que utiliza un vector lentiviral para producir el gen *Nfa1* de *N. fowleri*. Los ratones vacunados, presentaron un 90% más de supervivencia que los ratones control, los cuales murieron a las dos semanas. Estos resultados son muy prometedores, pero deben realizarse más estudios para entender el verdadero potencial de este método para proteger a seres humanos de MAP (27).

Para el resto de las medidas profilácticas, se sugiere la iniciación de una campaña de concienciación a la población general sobre hábitos de seguridad y protección, especialmente en torno a los eventos relacionados con actividades acuáticas. Las recomendaciones que estas campañas deberían incluir son (10):

- No participar en actividades acuáticas cerca de agua estancada y caliente, especialmente si hay poca profundidad y flujo débil.
- Taparse la nariz o usar pinzas nasales o gafas con protección nasal si se va a participar en actividades acuáticas en agua potencialmente contaminada.
- Mantener la cabeza por encima de la superficie del agua cuando se nade en agua dulce, aguas termales u otras masas de agua no tratadas.
- Evitar saltar o zambullirse en agua dulce estancada.
- No excavar o agitar los sedimentos del fondo del agua.
- Buscar ayuda médica inmediata si empieza a desarrollar síntomas tras participar en actividades acuáticas.
- Los propietarios de piscinas, spas y jacuzzis deben desinfectarlos y llevar a cabo las labores de mantenimiento adecuadas.
- Debe usarse agua hervida, filtrada o estéril para la irrigación de los senos nasales, en vez de usar agua del grifo.

## 5 CONCLUSIONES

La meningoencefalitis amebiana primaria es una enfermedad de muy baja incidencia pero muy alta mortalidad, que ha afectado a unas 400 personas desde que se tienen registros y de los cuales han sobrevivido menos de diez. Afecta especialmente a niños, durante los meses de verano, al ser los pacientes y la época del año más susceptible de producir la infección, la cual se produce por el contacto directo entre las fosas nasales del hospedador y el agente causal de esta afección, la "ameba come-cerebros" *N. fowleri*, una ameba parásita clasificada como ameba limax, durante las actividades acuáticas realizadas en masas de agua dulce donde habita el parásito.

La sintomatología de esta afección es muy similar a una meningitis de etiología bacteriana o vírica de muy rápida evolución que no responde a tratamientos antibióticos habituales. El nombre coloquial que recibe este parásito viene dado por las características necrotizantes devastadoras que deja a su paso en el tejido cerebral de las víctimas por su infección.

Estas características hacen que esta enfermedad tenga un difícil diagnóstico basado principalmente en el análisis del LCR y biopsias de tejido cerebral realizadas *post-mortem*.

El tratamiento actual está basado en la combinación de anfotericina B con otros fármacos, pero es inespecífico y poco eficaz, produciendo reacciones adversas. Existe un bajo interés de la industria farmacéutica por buscar otras alternativas dada la baja incidencia de esta infección. La mejor estrategia para la búsqueda de nuevos tratamientos es, por tanto, la reutilización de fármacos ya comercializados con otras indicaciones, sobre los cuales hay varios estudios que aportan resultados prometedores para el futuro tratamiento de esta enfermedad.

A día de hoy, la prevención es la mejor arma que tenemos contra *Naegleria fowleri*. La estrategia profiláctica esencial es evitar el contacto con agua potencialmente contaminada y nuestras fosas nasales, mediante el uso de barreras físicas, como pinzas o gafas con protección nasal si vamos a participar en actividades acuáticas en masas de agua dulce estancadas y calientes o la esterilización y correcta desinfección del agua usada para irrigaciones nasales y para uso lúdico, como piscinas o jacuzzis.

En conclusión, la potencial peligrosidad de la meningoencefalitis amebiana primaria viene dada por su rápida evolución y alta mortalidad y, aunque las características de esta afección no la convierten en candidata a producir un evento pandémico que suponga un riesgo urgente a enfrentar por el sistema sanitario, los avances en su manejo terapéutico son igualmente importantes y se deben centrar en la familiarización de los profesionales sanitarios con su cuadro clínico, la investigación del agente causal para detectar posibles dianas terapéuticas en el desarrollo de nuevos fármacos y la instauración de las medidas profilácticas en la población.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Becerril Flores MA. Amibas de vida libre con potencial patógeno | Parasitología Médica, 6e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. 2023 [citado 2 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://accessmedicina-mhmedical-com.bucm.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=3370&sectionid=279394781>
2. Sabana MLPRU de la, Sabana J de JAOU de la. Amibas de vida libre en seres humanos / Free-living amoebae in humans. instname: Universidad del Norte [Internet]. 15 de diciembre de 2009 [citado 2 de marzo de 2024]; Disponible en: <https://manglar.uninorte.edu.co/handle/10584/2318>
3. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al. A Higher Level Classification of All Living Organisms. PLoS One [Internet]. 29 de abril de 2015 [citado 2 de marzo de 2024];10(4):e0119248. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119248>
4. Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, et al. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 2 de marzo de 2024];66(1):4-119. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jeu.12691>
5. Gharpure R, Bliton J, Goodman A, Ali IKM, Yoder J, Cope JR. Epidemiology and Clinical Characteristics of Primary Amebic Meningoencephalitis Caused by Naegleria fowleri: A Global Review. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 1 de julio de 2021 [citado 2 de marzo de 2024];73(1):e19-27. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa520>
6. CULBERTSON CG, SMITH JW, COHEN HK, MINNER JR. Experimental Infection of Mice and Monkeys by Acanthamoeba. Am J Pathol [Internet]. 1 de enero de 1959 [citado 3 de marzo de 2024];35(1):185. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1934806/>
7. Fowler M, Carter RF. Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to Acanthamoeba sp.: a Preliminary Report. Br Med J [Internet]. 25 de septiembre de 1965 [citado 2 de marzo de 2024];2(5464):734-42. Disponible en: <https://www.bmj.com/content/2/5464/734.2>
8. Siddiqui R, Karim I, Ali M, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of Naegleria fowleri. Acta Trop [Internet]. 2016 [citado 25 de marzo de 2024];164:375-94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.009>
9. Naegleria fowleri — Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) — Amebic Encephalitis | CDC [Internet]. [citado 8 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/index.html>
10. Ahmad Zamzuri M 'Ammar I, Abd Majid FN, Mihat M, Ibrahim SS, Ismail M, Abd Aziz S, et al. Systematic Review of Brain-Eating Amoeba: A Decade Update. International Journal of Environmental Research and Public Health 2023, Vol 20, Page 3021 [Internet]. 9 de febrero de 2023 [citado 2 de marzo de 2024];20(4):3021. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/20/4/3021/htm>
11. Güémez A, García E. Primary amoebic meningoencephalitis by naegleria fowleri: Pathogenesis and treatments. Biomolecules. 1 de septiembre de 2021;11(9).
12. Che X, He Z, Tung TH, Xia H, Lu Z. Diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis by metagenomic next-generation sequencing: A case report. Open Life Sci. 1 de enero de 2023;18(1).
13. Grace E, Asbill S, Virga K. Naegleria fowleri: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1 de noviembre de 2015 [citado 17 de marzo de 2024];59(11):6677. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4604384/>
14. Jamerson M, da Rocha-Azevedo B, Cabral GA, Marciano-Cabral F. Pathogenic Naegleria fowleri and non-pathogenic Naegleria lovaniensis exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. Microbiology (N Y) [Internet]. 1 de marzo de 2012 [citado 25 de marzo de 2024];158(3):791-803. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.055020-0>
15. Jamerson M, Schmoyer JA, Park J, Marciano-Cabral F, Cabral GA. Identification of Naegleria fowleri proteins linked to primary amoebic meningoencephalitis. Microbiology (United Kingdom) [Internet]. 1 de marzo de 2017 [citado 25 de marzo de 2024];163(3):322-32. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000428>
16. Jeong SR, Lee SC, Song KJ, Park S, Kim K, Kwon MH, et al. Expression of the nfa1 Gene Cloned from Pathogenic Naegleria fowleri in Nonpathogenic N. gruberi Enhances Cytotoxicity against CHO Target Cells In Vitro. Infect Immun [Internet]. julio de 2005 [citado 25 de marzo de 2024];73(7):4098. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168563/>
17. Mujadid A, Burki K, Satti L, Mahboob S, Onaiz S, Anwar Z, et al. Successful Treatment of Confirmed Naegleria fowleri Primary Amebic Meningoencephalitis. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid3004.230979>
18. Ghanchi NK, Jamil B, Khan E, Ansar Z, Samreen A, Zafar A, et al. Case Series of Naegleria fowleri Primary Amebic Meningoencephalitis from Karachi, Pakistan. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 11 de noviembre de 2017 [citado 26 de marzo de 2024];97(5):1600. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5817751/>

19. Cope JR, Conrad DA, Cohen N, Cotilla M, Dasilva A, Jackson J, et al. Use of the Novel Therapeutic Agent Miltefosine for the Treatment of Primary Amebic Meningoencephalitis: Report of One Fatal and One Surviving Case. *Clin Infect Dis* [Internet]. 3 de marzo de 2016 [citado 26 de marzo de 2024];62(6):774. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4775347/](#)
20. Vargas-Zepeda J, Gómez-Alcalá A V., Vázquez-Morales JA, Licea-Amaya L, De Jonckheere JF, Lares-Villa F. Successful Treatment of *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis by Using Intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin. *Arch Med Res*. 1 de enero de 2005;36(1):83-6.
21. Linam WM, Ahmed M, Cope JR, Chu C, Visvesvara GS, Da Silva AJ, et al. Successful Treatment of an Adolescent with *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis. *Pediatrics* [Internet]. 1 de marzo de 2015 [citado 26 de marzo de 2024];135(3):e744. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4634363/](#)
22. Debnath A, Nelson AT, Silva-Olivares A, Shibayama M, Siegel D, McKerrow JH. In vitro efficacy of ebselen and BAY 11-7082 against *Naegleria fowleri*. *Front Microbiol* [Internet]. 6 de marzo de 2018 [citado 27 de marzo de 2024];9(MAR):334310. Disponible en: [www.frontiersin.org](#)
23. Hahn HJ, Debnath A. In Vitro Evaluation of Farnesyltransferase Inhibitor and its Effect in Combination with 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase Inhibitor against *Naegleria fowleri*. *Pathogens* 2020, Vol 9, Page 689 [Internet]. 22 de agosto de 2020 [citado 27 de marzo de 2024];9(9):689. Disponible en: [https://www.mdpi.com/2076-0817/9/9/689/htm](#)
24. Kim JH, Jung SY, Lee YJ, Song KJ, Kwon D, Kim K, et al. Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. noviembre de 2008 [citado 27 de marzo de 2024];52(11):4010-6. Disponible en: [https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00197-08](#)
25. Kim JH, Lee YJ, Sohn HJ, Song KJ, Kwon D, Kwon MH, et al. Therapeutic effect of rokitamycin in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Int J Antimicrob Agents*. 1 de noviembre de 2008;32(5):411-7.
26. Debnath A, Tunac JB, Galindo-Gómez S, Silva-Olivares A, Shibayama M, McKerrow JH. Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified from a high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. noviembre de 2012 [citado 27 de marzo de 2024];56(11):5450-7. Disponible en: [https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00643-12](#)
27. Kim JH, Sohn HJ, Lee J, Yang HJ, Chwaë YJ, Kim K, et al. Vaccination with lentiviral vector expressing the *nfa1* gene confers a protective immune response to mice infected with *Naegleria fowleri*. *Clinical and Vaccine Immunology* [Internet]. julio de 2013 [citado 26 de marzo de 2024];20(7):1055-60. Disponible en: [https://journals.asm.org/journal/cvi](#)

---

Juan Carlos Manzano Ayuso  
[juanmanz@ucm.es](mailto:juanmanz@ucm.es)

**Título del Trabajo de Fin de Grado:** Meningoencefalitis amebiana primaria causada por la ameba "come-cerebros" *Naegleria fowleri*.

**Tutor:** Francisco Ponce Gordo.

**Centro de realización/presentación:** Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

**Fecha de lectura:** Junio de 2024.





# INVESTIGACIONES

## B R E V E S

### Angela Valcárcel Olmeda

Alfa-Gal, epítipo responsable de la alergia a la carne roja,  
en la garrapata mediterránea *Hyalomma lusitanicum*

### Javier Colmena Zaragoza

Anticuerpos anti-*Anisakis* en pacientes con cáncer de colon  
y su relación con los linfocitos T  $\gamma\delta$

### Juan González-Fernández

La IgA sérica contribuye a la comprensión de la urticaria crónica  
asociada a *Anisakis simplex*

### María Piedad de la Hoz Martín

Prevalencia de la anisakiosis en Madrid (España)  
tras 20 años de Legislación preventiva

### Celia Bolumburu Cámara

*Trichomonas vaginalis*: epidemiología en un hospital terciario  
y caracterización biomolecular de aislados clínicos

# Alfa-Gal, epítopo responsable de la alergia a la carne roja, en la garrapata mediterránea *Hyalomma lusitanicum*

## Resumen

---

**E**l oligosacárido  $\alpha$ -Gal es una fracción carbohidratada que se encuentra predominantemente en las glicoproteínas de las células de mamíferos no primates. Los humanos han desarrollado una respuesta inmune a la exposición a este carbohidrato. La exposición al antígeno a través de mordeduras de garrapatas induce la producción de IgE anti- $\alpha$ -Gal, lo que provoca, en individuos predispuestos, una reacción de hipersensibilidad de tipo I denominada alergia a la carne de mamíferos (*mammalian meat allergy-MMA*), que se caracteriza por la manifestación de reacciones alérgicas, urticaria o anafilaxia, de forma tardía tras el consumo de carne o vísceras de mamíferos.

En España, se ha relacionado con la especie *Ixodes ricinus*, debido al solapamiento de las áreas endémicas con la distribución de los casos. El número de casos notificados puede estar subestimado debido a la falta de un diagnóstico adecuado. Por ello, es necesario evaluar el potencial de las especies más abundantes en el país como posibles fuentes de sensibilización y, por tanto, su capacidad para inducir MMA. Por este motivo, determinamos la presencia de  $\alpha$ -Gal en extractos proteicos hidrosolubles de glándulas salivares y tractos digestivos de *Hyalomma lusitanicum* recolectados de vegetación y de aquellos alimentados con ciervos, mediante la técnica de ELISA indirecto. Obtuvimos valores muy altos en glándulas y muy bajos en tractos digestivos, sin diferencias significativas entre machos y hembras.

Varios estudios previos determinaron la presencia de  $\alpha$ -Gal en saliva, glándulas salivares e intestinos de diferentes especies de garrapatas. Estos autores indicaron que la presencia de  $\alpha$ -Gal en el tracto gastrointestinal de estas garrapatas es un remanente de la alimentación realizada antes de la muda al estado adulto.

Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de  $\alpha$ -Gal ni a nivel de las glándulas ni del tracto intestinal, entre garrapatas recolectadas de vegetación y alimentadas sobre ciervos.

En nuestro estudio, la concentración de  $\alpha$ -Gal fue mayor en las glándulas salivares que en el tracto gastrointestinal. Este hecho sugiere que el grado de alimentación no parece afectar la presencia de  $\alpha$ -Gal en la garrapata, debido a que la reacción del anticuerpo específico en las glándulas salivares de *H. lusitanicum* recolectadas de ciervos fue similar a la de especímenes del mismo sexo recolectados de la vegetación. Esto podría indicar que su presencia no se debe a la ingestión de sangre de mamíferos no primates.

Esto ya había sido sugerido por otros autores que evidenciaron la presencia de genes que codifican enzimas galactosiltransferasas en *Ixodes scapularis*. La presencia de  $\alpha$ -Gal se observó en las glándulas salivares y tractos digestivos de garrapatas no alimentadas y parcialmente alimentadas artificialmente con sangre humana, evidenciando la capacidad de síntesis de  $\alpha$ -Gal por la garrapata. En este trabajo hemos confirmado que las proteínas que presentan el epítipo alergénico son de alto peso molecular (>250 kDa) y están presentes en una alta proporción en las glándulas salivares según se confirmó mediante la técnica ELISA. Además, no se observaron diferencias en función del sexo. Estudios previos identificaron proteínas de 50 kDa en el extracto hidrosoluble de glándulas salivares de *Hyalomma longicornis* y proteínas de 200 y 40 kDa en saliva de *Amblyomma sculptum* con epítipos  $\alpha$ -Gal. Esto parece indicar que el epítipo  $\alpha$ -Gal está presente en diferentes proteínas de las glándulas salivares en función de la especie de garrapata estudiada. En nuestro caso, al disminuir la cantidad de acrilamida en el gel (7,5%), pudimos observar la presencia de varias bandas, lo que confirma la presencia de diferentes proteínas con el epítipo azucarado capaces de desencadenar una reacción alérgica.

Es necesario identificar proteínas en extracto de garrapatas mediante sueros de pacientes con MMA grave para demostrar la alergenicidad de antígenos de *H. lusitanicum*.

Investigaciones previas determinaron la presencia de proteínas con epítipos  $\alpha$ -Gal en las glándulas salivares de *Hyalomma marginatum*, una especie filogenéticamente cercana a *H. lusitanicum*, a través del reconocimiento de IgE en sueros de pacientes con reacciones anafilácticas a la picadura de estas especies y de un individuo con una historia frecuente de picaduras de garrapatas. Algunos autores sugirieron que las proteínas presentes en la saliva de las garrapatas, responsables de las reacciones alérgicas en el hospedador, podrían participar en el desarrollo de MMA. Sabiendo que *H. lusitanicum* es capaz de alimentarse de humanos, es posible que sea capaz de causar MMA en individuos sensibilizados. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, es necesario realizar estudios de reconocimiento de estas proteínas por IgE anti- $\alpha$ -Gal presente en sueros de pacientes con sensibilización a este epítipo.

Este es un estudio preliminar, por lo tanto, sus resultados son limitados y se necesitan más investigaciones. El objetivo principal fue determinar la presencia o ausencia de  $\alpha$ -Gal en dos extractos diferentes de *H. lusitanicum* (glándulas salivares y tracto digestivo). Para demostrar la relación entre *H. lusitanicum* y el desarrollo de MMA, se necesitan estudios más avanzados que incluyan sueros de pacientes e historial clínico, entre otros.

“  
Varios estudios previos determinaron la presencia de  $\alpha$ -Gal en saliva, glándulas salivares e intestinos de diferentes especies de garrapatas.  
”

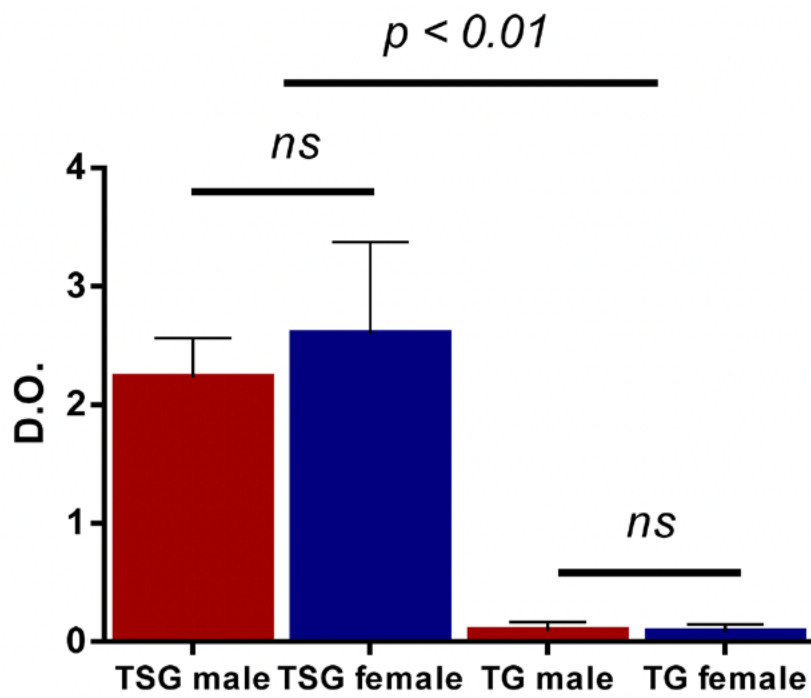
Ángela Valcárcel Olmeda  
angelavalcarcelolmeda@gmail.com

**Título del Artículo:** Alfa-Gal, epítipo responsable de la alergia a la carne roja, en la garrapata mediterránea *Hyalomma lusitanicum*.

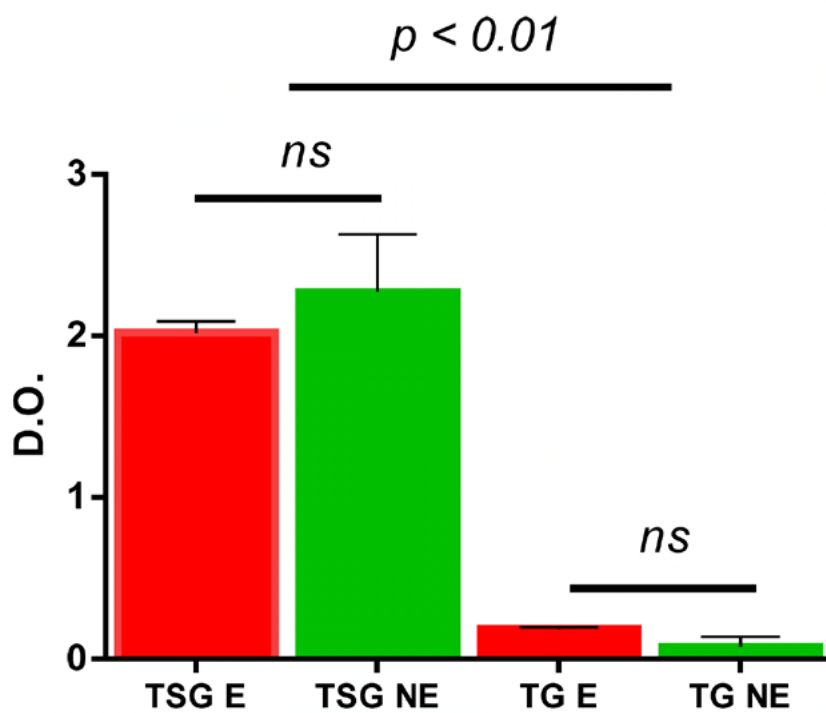
**Autora:** Ángela Valcárcel Olmeda.

**Dirección:** Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

**Referencia bibliográfica:** Valcárcel Á, Montero AB, Rodero M, González-Fernández J, Olmeda AS, Valcárcel F, Cuéllar C. Alpha-Gal, epitope responsible for allergy to red meat, in the Mediterranean tick *Hyalomma lusitanicum*. *Med Vet Entomol*. 2024 Sep;38(3):366-371. doi: 10.1111/mve.12724. Epub 2024 May 13. PMID: 38741222.



**Figura 1.** Presencia de proteínas con epítomos  $\alpha$ -Gal en el extracto proteico de las glándulas salivales (TSG) y tractos digestivos (TG) de hembras (female) y machos (male) de *Hyalomma lusitanicum*. D.O., valores de densidad óptica leídos a 490 nm en un espectrofotómetro.



**Figura 2.** Presencia de proteínas con epítomos  $\alpha$ -Gal en el extracto proteico de las glándulas salivales (TSG) y tractos digestivos (TG) de adultos alimentados (E) y no alimentados (NE) de *Hyalomma lusitanicum*. D.O., valores de densidad óptica leídos a 490 nm en un espectrofotómetro.

# Anticuerpos anti-*Anisakis* en pacientes con cáncer de colon y su relación con los linfocitos T $\gamma\delta$

## Resumen

---

**E**n este estudio se evalúan, por primera vez, los niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas anti-*Anisakis* en pacientes con cáncer de colon (CC), relacionándolos con la inmunidad de los linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . El primer hallazgo sobresaliente de la investigación fue el aumento significativo de los niveles de todos los isotipos específicos anti-*Anisakis* en pacientes con CC frente a los controles, con tasas de positividad de IgM e IgE significativamente más altas en pacientes con CC.

Estudios previos demostraron similitudes en el comportamiento inmunológico en las infecciones y en el cáncer: disminución de la inmunidad de los linfocitos T y aumento de la apoptosis. Esto plantea la cuestión de si un patógeno que mantiene una respuesta inflamatoria persistente podría tener influencia en procesos de oncogénesis.

Los tumores de alto grado tienden a crecer y diseminarse más rápidamente a otros tejidos y, por lo tanto, tienen un mal pronóstico. Los niveles más altos de anticuerpos y las tasas de positividad más altas para IgM anti-*Anisakis* se encontraron en pacientes con CC de alto grado, mientras que los niveles más bajos se observaron en CC de bajo grado. Esto podría indicar un mayor riesgo de infección por *Anisakis* en pacientes que tenían un mal pronóstico (alto grado), aunque no se observaron diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  entre alto grado y bajo grado.

Aunque la mayoría de los pólipos nunca se convertirán en cáncer colorrectal, múltiples mutaciones somáticas en los linajes de células epiteliales, ya preexistentes en la etapa pólipo-adenoma, contribuyen efectivamente al desarrollo y progresión de la malignidad. En este estudio, analizamos la presencia de pólipos adicionales a las lesiones tumorales encontradas durante la colonoscopia y en la muestra de tejido. También demostramos un aumento significativo en los niveles de IgM anti-*Anisakis* y del porcentaje de sujetos con resultado positivo para pólipos adicionales en el grupo de pacientes con CC. Esto sugiere una clara relación entre *Anisakis* y la presencia de pólipos porque hubo un aumento de todas las inmunoglobulinas anti-*Anisakis* en pacientes con pólipos adicionales.

La invasión angiolinfática (IA) se considera un factor de riesgo importante correlacionado con un desenlace adverso. La importancia pronóstica de la afectación de pequeños vasos submucosos se asocia con un mayor riesgo de metástasis en ganglios linfáticos regionales, y la afectación de la invasión venosa extramural se asocia con un mayor riesgo de metástasis hepática. La IgA claramente desempeña un papel crucial en la protección de las superficies mucosas contra el ataque de patógenos invasores y presumiblemente es capaz de eliminar también células malignas a este nivel.

En este estudio, confirmamos un aumento de IgA anti-*Anisakis* en pacientes con CC e IA. Si hay un aumento de la infección por *Anisakis* en una situación de déficit de linfocitos T y con IA, parece lógico que el sistema inmunológico monte una respuesta con un aumento del isotipo de anticuerpo más abundante asociado a las membranas mucosas, lo que resulta en mayores aumentos en los niveles séricos de IgA específica.

La reacción inmune alérgica mediada por IgE en el curso de la infección por *Anisakis* implica una respuesta de memoria de tipo Th2 secundaria paralela y una estimulación inmunológica primaria de las subpoblaciones tanto Th2 como Th1.

El papel antiinflamatorio y protumoral de la respuesta Th2 está bien establecido. La diferenciación de las células Th2 depende de la IL-4 a través de la señalización de STAT6. La sobreexpresión de STAT6, detectada en el microambiente inmune del cáncer, promueve la inmunosupresión y la formación de metástasis al promover la angiogénesis.

La presencia de todos los isotipos de inmunoglobulinas anti-*Anisakis* refleja una amplia respuesta inmune que involucra tanto a linfocitos Th2 como Th1. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de una infección remota por *Anisakis* en el tiempo debido a la producción elevada de IgG e IgE con reinfecciones con el parásito cercanas al diagnóstico de CC.

En conclusión, todos los diferentes isotipos de anticuerpos anti-*Anisakis* fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con CC. Los porcentajes de sueros positivos para IgM e IgE anti-*Anisakis* también fueron significativamente mayores en pacientes con CC. El grado de diferenciación tumoral y la poliposis se relacionaron con niveles altos y tasas de positividad de IgM anti-*Anisakis*.

Los valores de linfocitos T  $\gamma\delta$  y linfocitos T CD4+  $\alpha\beta$  fueron significativamente menores en pacientes con CC. La apoptosis aumentó significativamente en los linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  en pacientes con CC.

Estudios experimentales previos sugieren relación entre *Anisakis* y la alteración de las células epiteliales así como con su posible transformación maligna. Aunque nuestros resultados vinculan claramente *Anisakis* con CC, se necesitan más investigaciones para demostrar si este parasitismo es un factor productor de tumores o una consecuencia de la deficiencia de linfocitos T independiente de la etiología del cáncer.

Javier Colmena Zaragoza  
xavicol10@gmail.com

---

**Título del Artículo:** Anticuerpos anti-*Anisakis* en pacientes con cáncer de colon y su relación con los linfocitos T  $\gamma\delta$ .

**Autor:** Javier Colmena Zaragoza.

**Dirección:** SESCV (Servicio de Emergencias Sanitarias de la Comunidad Valenciana), Valencia.

**Referencia bibliográfica:** Andreu-Ballester JC, Cuéllar C, Colmena-Zaragoza J, Galindo-Regal I, Hurtado-Marcos C, González-Fernández J, Balciscueta Z, García-Ballesteros C, López-Chuliá F, Jiménez AI, Llombart-Cussac A. Anti-*Anisakis* antibodies in colon cancer patients and their relationship with  $\gamma\delta$  T-cells. *Parasitol Res.* 2024 Apr 25;123(4):196. doi: 10.1007/s00436-024-08216-y. PMID: 38662084; PMCID: PMC11045616.

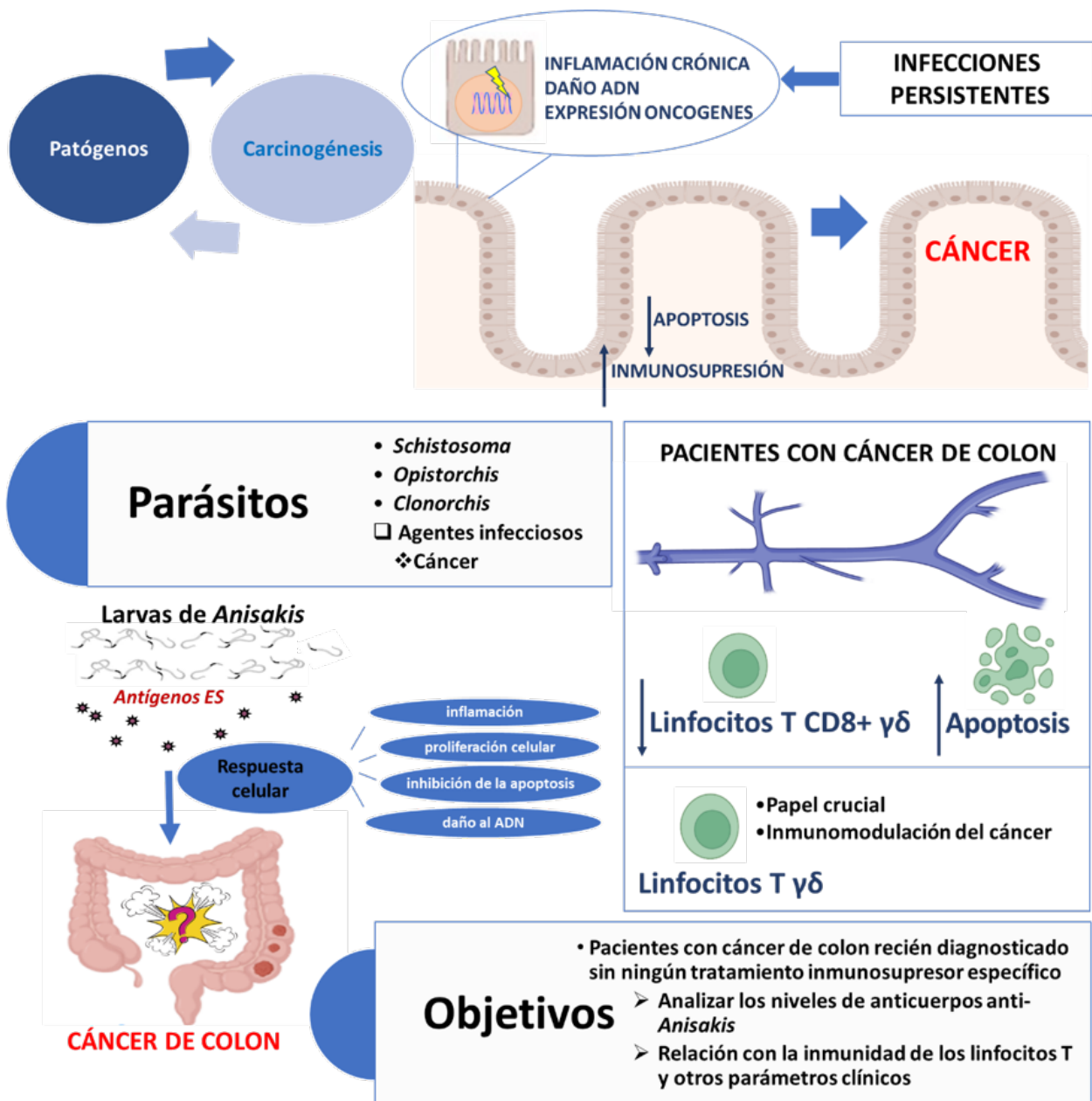
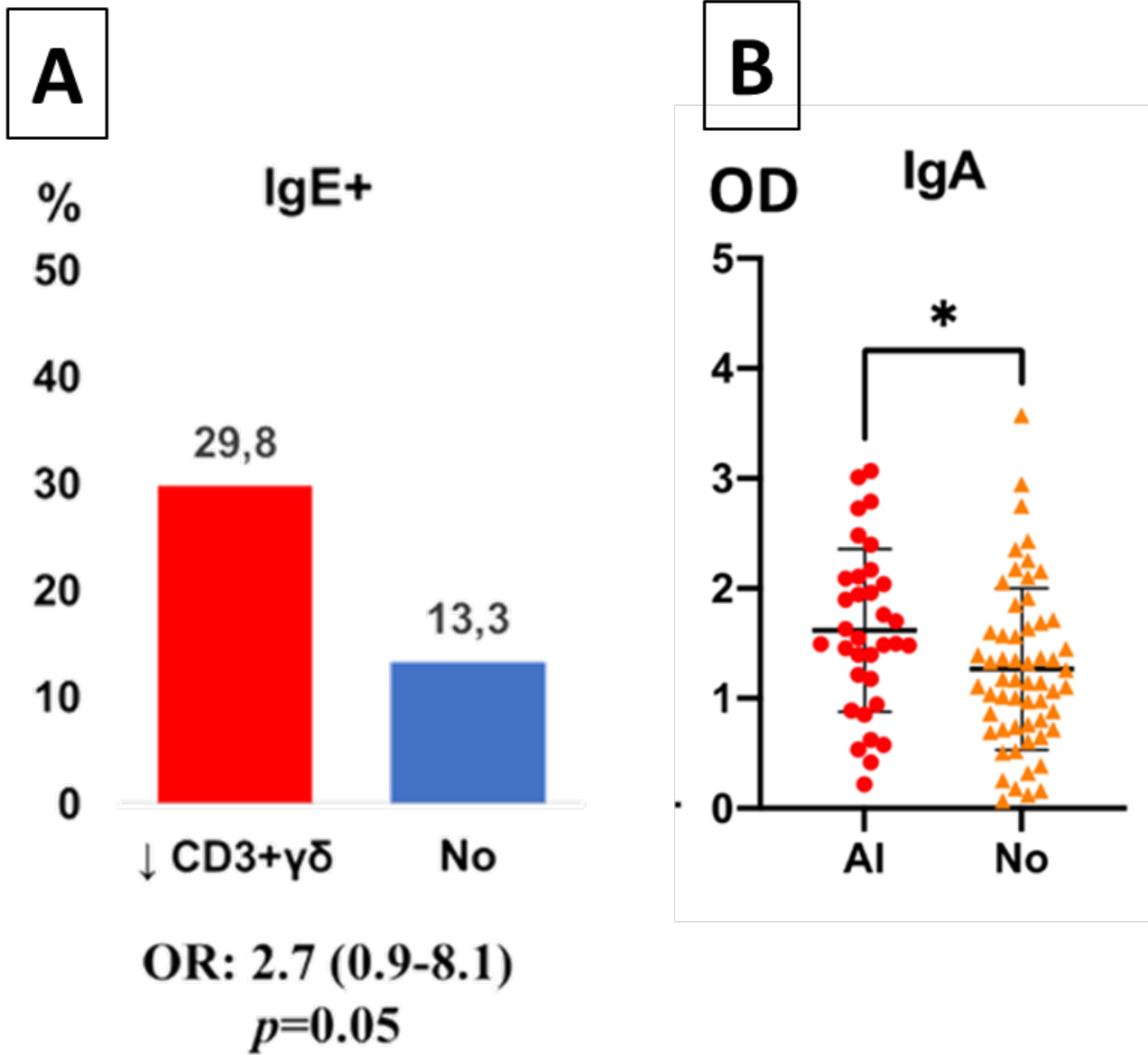


Figura 1. Muchos patógenos están relacionados con carcinogénesis. La inflamación crónica, como resultado de infecciones persistentes, conduce a daños en el ADN, mayor expresión de oncogenes, disminución de la apoptosis e inmunosupresión, que inducen cáncer.



**Figura 2.** (A) Porcentaje de sueros positivos para IgE anti-Anisakis en pacientes con cáncer de colon con o sin deficiencia de células T CD3+ γδ, Odds ratio, OR: (IC95%) (Prueba exacta de Fisher). (B) Inmunoglobulinas (IgA) anti-Anisakis en suero de pacientes con cáncer de colon (CC, n=92) según invasión angiolinfática (AI, n=34) o no (n=58). (Media y desviación) (U de Mann-Whitney; \**p* < 0,05).

# La IgA sérica contribuye a la comprensión de la urticaria crónica asociada a *Anisakis simplex*

## Resumen

---

**S**e determinaron citoquinas séricas y los niveles de IgE, IgG4 e IgA humanas específicas frente a los antígenos totales y de excreción-secreción (ES) de *Anisakis*, así como frente a alérgenos específicos (Ani s 1/Ani s 3/Ani s 7/Ani s 13) en pacientes con anisakiosis gastroalérgica/AGA y urticaria crónica (UC) asociada a sensibilización/UC+.

En AGA y UC+, los niveles de IgE, IgG4 e IgA anti-*Anisakis* aumentaron en comparación con los controles debido al contacto previo con larvas vivas.

La IgE anti-Ani s 3 (tropomiosina de *Anisakis*) no mostró diferencias entre los grupos, comportándose como panalérgeno. La IgG4 anti-Ani s 3 aumentó en los controles con respecto a AGA, UC+ y UC- (UC sin sensibilización).

Los pacientes con UC, enfermedad multifactorial de etiología incierta, desarrollan una respuesta inmune mediada por citoquinas proinflamatorias como IL-6 o IL-17. Los pacientes AGA y UC+ produjeron IgA anti-*Anisakis* pero hubo diferencias entre UC- y controles para el extracto total y Ani s 7. Esto indica que los pacientes diagnosticados de UC, incluso no siendo positivos a *Anisakis*, presentaban IgA sérica específica. Los antígenos de *Anisakis* se ingieren habitualmente cuando comemos peces de origen marino. La mayor producción de IgA se localiza en el intestino, pero una barrera mucosa deteriorada o inflamada puede estar asociada con niveles séricos aumentados. En el caso de la UC (UC+ y UC-), y específicamente en el grupo UC-, la IgA anti-*Anisakis* detectada en suero podría ser un anticuerpo polirreactivo. Actualmente no está clara la función de la IgA sérica y por qué la baja producción de IgA aumenta el riesgo de desarrollar infecciones o una enfermedad inmune sistémica como la UC.

Se ha investigado la IgA sérica como biomarcador ya que se asocia con los niveles de TGF- $\beta$ . Los niveles séricos de esta citoquina no mostraron diferencias significativas entre los grupos, pero se observó un aumento de TGF- $\beta$  en AGA y UC+ respecto a los grupos *Anisakis* negativos. Probablemente, el primer contacto con larvas vivas sea suficiente para inducir la producción de TGF- $\beta$ , aunque los niveles séricos pueden no ser adecuados para su determinación.

Observamos niveles bajos de IgG4 específica en pacientes con UC, por lo que calculamos la relación IgA/IgG4. Este cociente fue alto en pacientes con UC porque su patología podría ser la responsable de los niveles más elevados de IgA específica frente a *Anisakis*. La IgA sérica desempeña un doble papel en el sistema inmunológico. Está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis y la promoción de respuestas antiinflamatorias, pero también puede inducir inflamación. La IgG4 es un isotipo protector para las alergias. En AGA, la IgE y la IgG4 son altas, pero en UC+, la IgG4 es baja.

Ani s 3 y Ani s 13 fueron responsables del aumento del cociente IgA/IgG4, tal vez relacionado con la exposición intestinal como alérgenos clásicos de larvas muertas presentes en pescados cocinados o congelados.

En UC (UC+/UC-), los niveles de IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A fueron menores que en pacientes sin UC (AGA/controles). La AGA se acompaña de urticaria aguda en presencia de larvas vivas y es una condición transitoria. Los sueros se obtuvieron mucho después del episodio agudo, cuando los pacientes estaban asintomáticos. Sin embargo, los pacientes con UC sufrían urticaria activa.

Los niveles séricos de IFN- $\gamma$  se correlacionaron inversamente con la respuesta de anticuerpos con la excepción de la IgG4 anti-Ani s 3. Las respuestas proinflamatorias basales Th1 y Th17 (IFN- $\gamma$  e IL-17) son suprimidas por el efecto de la IL-10 inducida por los parásitos.

En nuestro estudio, se esperaba que los grupos positivos para *Anisakis* presentaran niveles más altos de citoquinas Th2 como IL-10, pero los controles presentaron más IL-10 que los pacientes con UC.

En los grupos *Anisakis* negativos, aunque hay niveles más bajos de IgA específica anti-Ani s 13, este anticuerpo se correlaciona con citoquinas proinflamatorias como IL-17A, ratio Th17/Th2 y ratio Tipo 1/Tipo 2. Este hecho puede indicar que los restos de larvas muertas podrían estar asociados con un ambiente proinflamatorio.

Este estudio demuestra la importante implicación de la IgA sérica en los fenotipos clínicos de las enfermedades relacionadas con *Anisakis*. Los cocientes IgA/IgG4 anti-ES, Ani s 1, 7 y 13, pero no Ani s 3, aumentaron en la UC con respecto a AGA y controles. Este cociente fue particularmente alto en el caso de Ani s 13 en pacientes UC-. Detectamos niveles bajos de IL-17A e IFN- $\gamma$  en la UC. En los grupos *Anisakis*-positivos, la relación IgA/IgG4 (anti-ES, Ani s 1, 7 y 13) permitió diferenciar AGA de UC+. La IgA anti-*Anisakis* desempeña un papel importante en el reconocimiento de los alérgenos de *Anisakis*, ya sea a través de la dieta o a través de la infección activa de larvas vivas, lo que arroja nueva luz sobre los mecanismos inmunológicos de los fenotipos de urticaria relacionados con *Anisakis*.

“ Observamos niveles bajos de IgG4 específica en pacientes con UC, por lo que calculamos la relación IgA/IgG4. ”

Juan González-Fernández  
juangonzalez@ucm.es

**Título del Artículo:** La IgA sérica contribuye a la comprensión de la urticaria crónica asociada a *Anisakis simplex*.

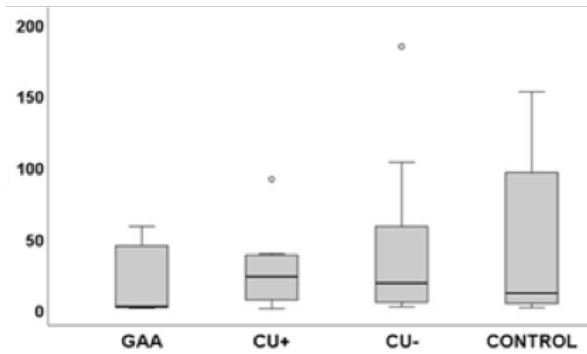
**Autor:** Juan González-Fernández.

**Dirección:** Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

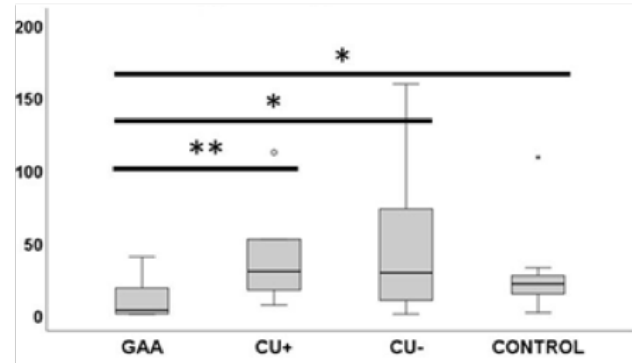
**Referencia bibliográfica:** González-Fernández J, Ullate L, Fernández-Fígares V, Rodero M, Daschner A, Cuéllar C. Serum IgA contributes to the comprehension of *Anisakis simplex* associated chronic urticaria. *Int Immunopharmacol*. 2024 Mar 10;129:111602. doi: 10.1016/j.intimp.2024.111602. Epub 2024 Feb 7. PMID: 38330800.

# Cociente IgA/IgG4

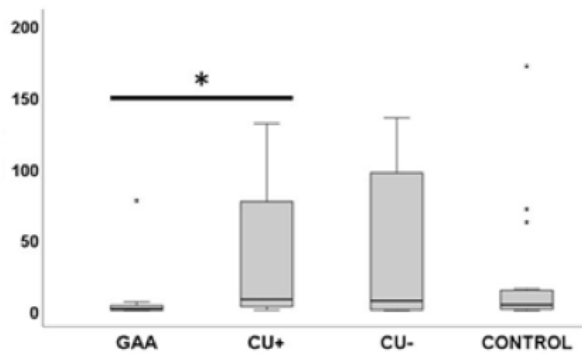
## Antígeno total



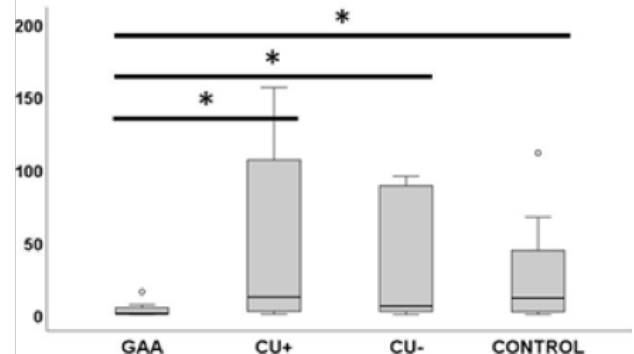
## Antígeno ES



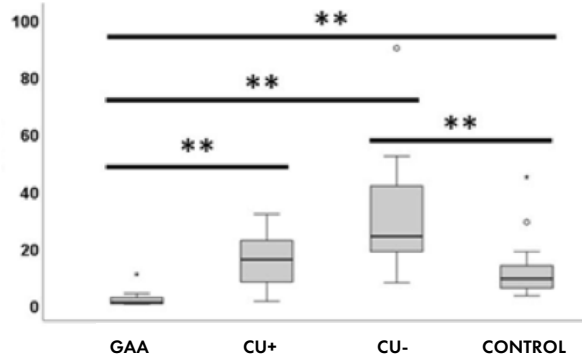
## Ani s 1



## Ani s 7



## Ani s 13



## Ani s 3

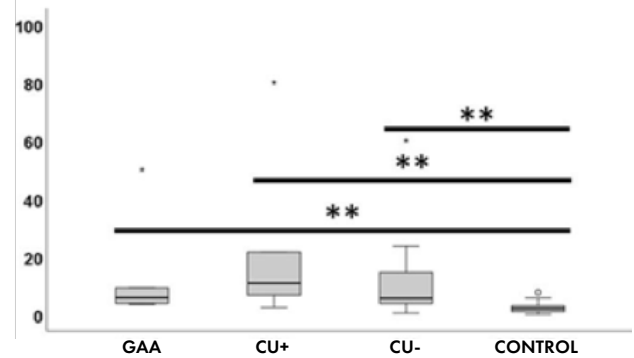
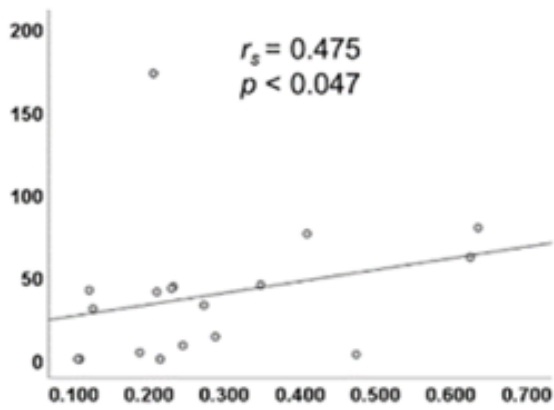
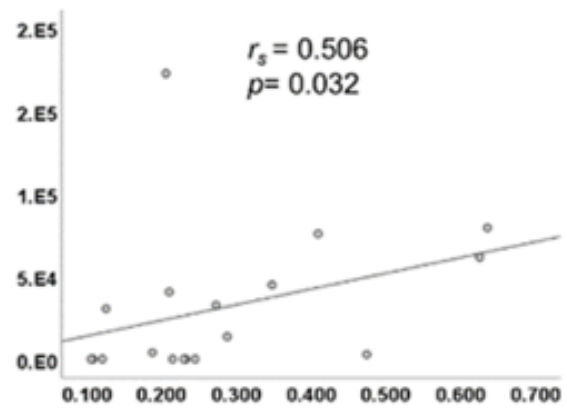


Figura 1. Cociente IgA/IgG4 frente a antígenos de *Anisakis* en diferentes pacientes con *Anisakis* y grupo control. (\*)  $p < 0,05$ . (\*\*)  $p < 0,01$ . GAA: anisakiosis gastroalérgica; CU+: urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis simplex*; CU-: urticaria crónica sin sensibilización frente a *Anisakis simplex*.

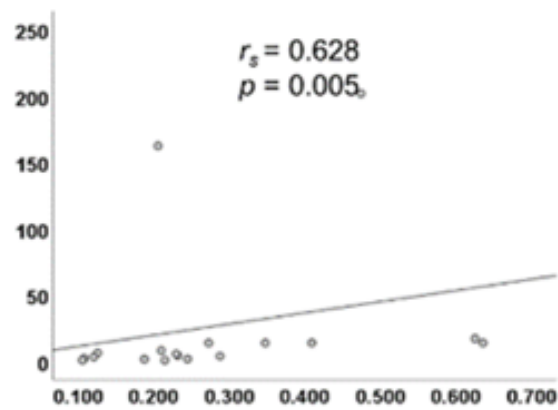
## IL-17A



## Cociente Th17/Th2



## Cociente Tipo 1/Tipo 2



**Figura 2.** Correlación de los niveles de IgA anti-Ani s 13 medidos como densidades ópticas a 490 nm con IL-17A sérica en pg/ml, cocientes de citoquinas Th17/Th2 [IL-17A/IL-4] y Tipo 1/Tipo 2 [IL-2+IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ +IL-17A+IL-6]/[IL-4+IL-10+logTGF- $\beta$ 1] en el grupo control. Los valores  $r_s$  representan los coeficientes de correlación de rangos de Spearman (con valores p). Las curvas se ajustaron con regresión lineal utilizando IBM SPSS v27.0.1.0

# Prevalencia de la anisakiosis en Madrid (España) tras 20 años de Legislación preventiva

## Resumen

---

**E**n 2004 entró en vigor en Europa el Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Aproximadamente dos años después, el 19 de diciembre de 2006, entró en vigor en España el Real Decreto (RD) 1420/2006. En él se incluye la obligación para los titulares de establecimientos que sirvan alimentos a consumidores finales o colectividades (bares, restaurantes, cafeterías, hoteles, hospitales, escuelas, residencias, comedores de empresa, empresas de catering y similares) de congelar los productos de la pesca (incluidos los encurtidos, salazones o ahumados en frío en los que la temperatura central del producto no haya superado los 60°C) que vayan a ser consumidos crudos, a una temperatura igual o inferior a -20°C durante al menos 24 h. Actualmente, este RD ha sido derogado para incluirlo en uno más amplio en el que aparecen nuevos detalles como un mínimo de 15 h de congelación a -35°C.

Según la reevaluación de los informes de 2010 realizada recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la congelación a una temperatura central de -15°C durante al menos 96 h, -20°C durante al menos 24 h, o -35°C durante al menos 15 h, y el calentamiento por encima de 60°C durante 1 min, siguen siendo los métodos más eficaces para matar las larvas.

A pesar de que la ley está en vigor, la EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) informaron en 2020 de que en España se habían producido dos brotes causados por defectos en la congelación de unos boquerones en vinagre con larvas de *Anisakis*. En este estudio, actualizamos la prevalencia de *Anisakis* en Madrid, España, empleando sueros de 500 donantes de sangre sanos y comparándolos con sueros de características similares analizados hace 20 años para comprobar el efecto profiláctico de la ley.

En nuestro estudio, la prevalencia de anisakiosis (IgE) en sueros de 2001 fue del 11,65%, lo que es consistente con otros estudios de prevalencia previos (12,4%). Los datos actuales de prevalencia de anisakiosis fueron del 2,2% en Madrid, lo que indica una marcada reducción. La prevalencia de anisakiosis en otros países europeos estuvo en línea con nuestros resultados: 3-9%/Portugal, 2%/Noruega, 0,4-12,7%/Italia y 2-2,5%/Croacia. Las tasas de prevalencia en otros países no europeos también fueron similares a las obtenidas en nuestro estudio: 5,1%/Marruecos, 10%/Japón y 5-6,65%/Corea del Sur.

Muchos otros factores, aparte de la legislación, principalmente relacionados con la educación sanitaria sobre el calentamiento o la congelación del pescado, pueden haber influido en la disminución observada de los casos. El actual marco legislativo español y europeo, junto con la difusión de noticias que alertan al público sobre la posible presencia de larvas de *Anisakis* en el pescado, ha tratado de aumentar la concienciación sobre el parásito en España. Dado que los requisitos legales obligan a los restaurantes y las empresas de catering a congelar el pescado antes de servirlo para inactivar las larvas de *Anisakis*, la reducción observada en la prevalencia de IgE específica del 12% al 2% sugiere que la población española ha adoptado hábitos preventivos eficaces contra la infección por *Anisakis*.

En el presente estudio, también detectamos seroprevalencias de IgG e IgA del 13,6%, que son similares a las obtenidas 20 años antes (15,55% y 14,54%, respectivamente). Esto indica que las personas continúan estando en contacto con antígenos de larvas muertas de *Anisakis* presentes en el pescado cocinado/congelado.

Nuestros hallazgos indican que otras investigaciones sobrestimaron la prevalencia de anisakiosis en España hasta en un 14,7-18,4%. Los factores que afectan a la parasitación no son sólo el nivel de exposición (consumo de pescado per cápita y tasas de parasitación de pescado) sino, más importante aún, los hábitos de consumo de pescado (pescado crudo o poco cocinado con larvas vivas).

En cuanto a la tasa de consumo de pescado, medida en kg/habitante/año, Portugal registró la tasa más alta de Europa (59,91), seguido de Noruega (54,56), Japón (46,74) y España (46,02) en 2019. Los resultados de nuestro estudio sobre el consumo de pescado indicaron que la frecuencia era de aproximadamente dos veces por semana, con una mediana de cinco veces al año para el pescado crudo.

En nuestra población, la tasa de consumo de pescado crudo fue baja, un 35% (0-10 veces al año), pero el 81% de nuestros participantes tenían una ingesta moderada (1-4 veces por semana) de pescado cocinado.

En conclusión, la prevalencia de anisakiosis en Madrid ha disminuido del 11,65% al 2,2% tras 20 años de legislación preventiva. La presencia constante de niveles de IgG e IgA sin IgE, sugieren una respuesta inmune local frente a los antígenos de *Anisakis*. Estos hallazgos resaltan la importancia de las políticas de salud pública en la reducción de la anisakiosis.

María Piedad de la Hoz Martín  
mdelaho@ucm.es

**Título del Artículo:** Prevalencia de la anisakiosis en Madrid (España) tras 20 años de Legislación preventiva.

**Autora:** María Piedad de la Hoz Martín.

**Dirección:** Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

**Referencia bibliográfica:** Blanco-Costales E, González-Quevedo AL, Lorenzo-Bernardo L, de la Hoz-Martín MP, Rodero M, Puente P, Moreno-Torres I, Cuéllar C, González-Fernández J. Prevalence of Anisakiasis in Madrid (Spain) after 20 Years of Preventive Legislation. Pathogens. 2024 Sep 11;13(9):782. doi: 10.3390/pathogens13090782. PMID: 39338973; PMCID: PMC11435309.

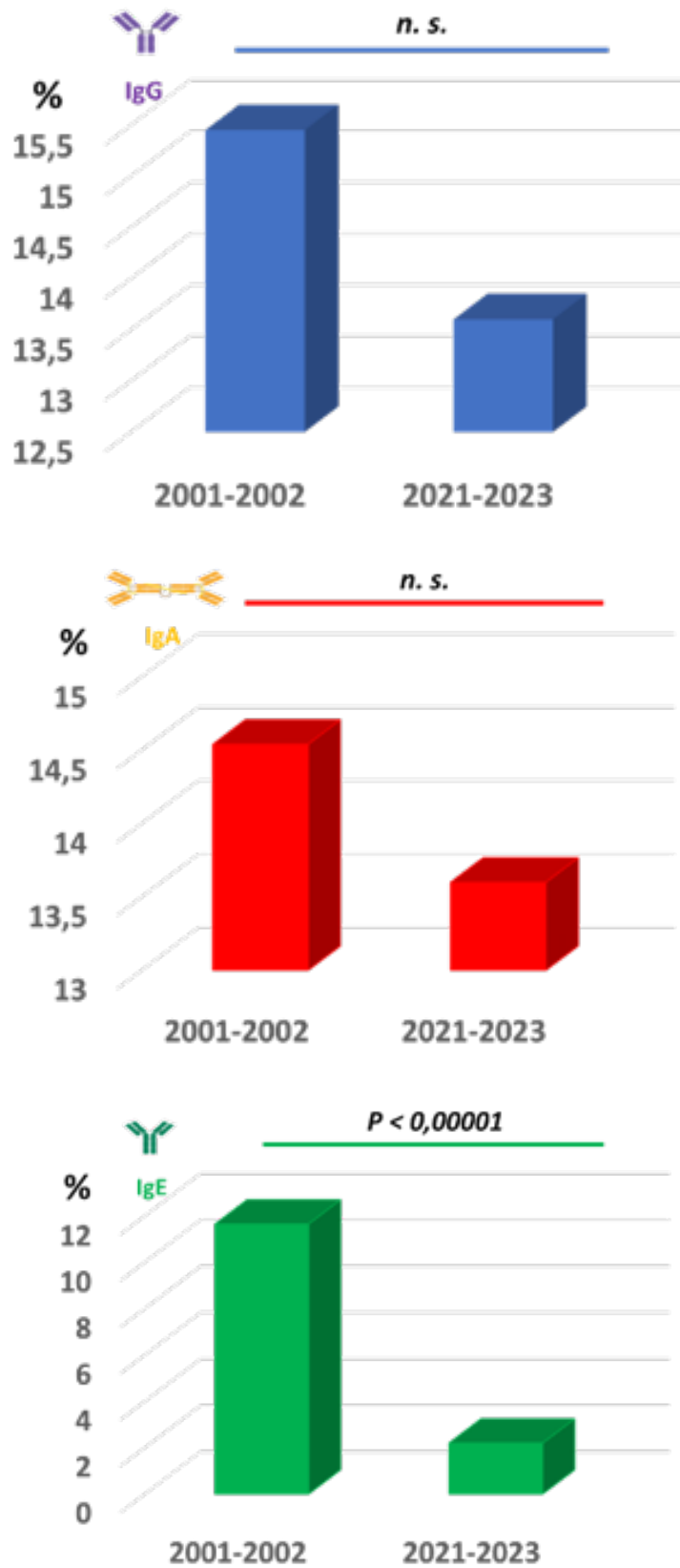


Figura 1. Porcentaje de positivos (D.O. $\bar{X}$ +SD) (IgG, IgA e IgE) anti-*Anisakis* en donantes de sangre de Madrid recogidos en 2001-2002 (n=110) vs donantes de sangre de Madrid recogidos en 2021-2023 (n=500). (Chi-Square).



Figura 2. Consumo de pescado por semana y de pescado crudo a lo largo del año en donantes de sangre del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid (2021-2023, n=500).

# *Trichomonas vaginalis*: epidemiología en un hospital terciario y caracterización biomolecular de aislados clínicos

## Resumen

---

La tricomonosis representa la infección de transmisión sexual (ITS) no vírica más prevalente a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud, se registran diariamente un millón de nuevos contagios por patógenos de transmisión sexual curable, entre los que se encuentra *Trichomonas vaginalis*. Los últimos informes de la OMS estiman una incidencia anual de 156 millones de casos, cifra que podría estar en aumento. A pesar de estos datos tan alarmantes, la investigación y la verdadera incidencia sobre esta infección en España son limitadas.

Uno de los factores limitantes es su exclusión de la lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria. Además, la presentación clínica de la tricomonosis es altamente heterogénea, con un alto número de casos asintomáticos, lo que sugiere que los datos de prevalencia están probablemente infraestimados.

La infección por *T. vaginalis* está asociada a una gran variedad de complicaciones, entre las que destacan: 1) un aumento significativo del riesgo de adquirir otras ITS, tales como clamidiasis, gonorrea, sífilis, herpes genital, papilomavirus y VIH; 2) un mayor riesgo de aborto y ruptura prematura de membranas en embarazadas; y 3) una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de cérvix en casos de infección crónica.

Recientemente, se ha descubierto que *T. vaginalis* puede albergar endobiontes de naturaleza vírica (*Trichomonas vaginalis* virus o TVV) y bacteriana (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Candidatus Mycoplasma girerdii*), los cuales parecen influir en su capacidad patogénica. Sin embargo, la interacción entre estos organismos y sus repercusiones aún se encuentran bajo investigación.

Este parásito se caracteriza por presentar un genoma notablemente extenso (160 Mb) con una considerable heterogeneidad entre sus aislados. Los análisis genéticos recientes han identificado dos grupos poblacionales, denominados tipo 1 y tipo 2. Los aislados pertenecientes al primer *clúster* tienden a ser más susceptibles a albergar TVV, mientras que los del tipo 2 parecen estar más asociados con la resistencia al fármaco de referencia, metronidazol.

Dada la escasez de estudios relacionados con las infecciones por *T. vaginalis* en España y el interés en correlacionar el comportamiento de estos parásitos con su genotipo, los **objetivos generales** que se plantearon en esta Tesis Doctoral fueron: 1) evaluar la prevalencia mediante un estudio observacional retrospectivo no intervencionista sobre los casos de tricomonosis diagnosticados en un hospital terciario de la Comunidad de Madrid, considerando las coinfecciones, la presentación clínica y los casos en embarazadas; y 2) analizar la correlación entre la sintomatología, la resistencia al metronidazol, la presencia de endobiontes en aislados clínicos de estos pacientes y dos marcadores moleculares: microsatélites y *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

Respecto al primer objetivo, los **resultados** reflejan una prevalencia media del 0,95% entre los años 2013-2021, con un remarcable descenso de los diagnósticos a raíz de la pandemia del SARS-CoV2. Resultó relevante que en el último trimestre del 2021 se acumuló el 57% de los casos anuales, sugiriendo una posible recuperación hacia los valores prepandémicos.

Entre los datos obtenidos, se observó un elevado número de coinfecciones con *Chlamydia trachomatis* (11%), *Mycoplasma hominis* (30%) y *Ureaplasma urealyticum* (45%). Además, el 8% de las mujeres diagnosticadas con tricomonosis eran gestantes, siendo significativamente más asintomáticas que la población general. Es importante destacar que el 10% de las embarazadas infectadas experimentaron complicaciones durante el embarazo, incluyendo rotura prematura de membranas.

Los estudios biológicos de los aislados clínicos permitieron identificar muestras resistentes a metronidazol, provenientes de pacientes que regresaron a consulta debido a la persistencia de síntomas. En cuanto a la presencia de endobiontes, los pacientes que albergaban parásitos con TVV mostraron una edad media significativamente mayor en comparación con aquellas infectadas con aislados TVV-. Sin embargo, estos aislados fueron más sensibles al metronidazol. La presencia de micoplasmas se asoció significativamente con una mayor sintomatología y una tendencia a mostrar cierta resistencia al metronidazol, aunque de forma no significativa.

“

*La infección por **T. vaginalis** está asociada a una gran variedad de complicaciones, entre las que destacan:*

- 1) un aumento significativo del riesgo de adquirir otras ITS, tales como clamidiasis, gonorrea, sífilis, herpes genital, papilomavirus y VIH;*
- 2) un mayor riesgo de aborto y ruptura prematura de membranas en embarazadas; y*
- 3) una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de cérvix en casos de infección crónica.*

”

En relación al segundo objetivo, este es el primer estudio que compara polimorfismos de tres microsátélites y MLST a partir de siete genes conservados en *T. vaginalis* a partir de muestras clínicas. Los análisis estadísticos no revelaron asociación entre ambos marcadores. Sin embargo, el uso de MLST permitió detectar infecciones mixtas, dos nuevos alelos y trece tipos de secuencia no identificados previamente. Asimismo, en el presente estudio, la presencia de *M. hominis* como endobionte no parece estar relacionado con ninguno de los dos tipos poblacionales estudiados.

“ Los estudios biológicos de los aislados clínicos permitieron identificar muestras resistentes a metronidazol, provenientes de pacientes que regresaron a consulta debido a la persistencia de síntomas. ”

A raíz de los resultados obtenidos, las **conclusiones** de esta Tesis Doctoral son: i) la prevalencia de la tricomonosis diagnosticada en el hospital terciario de la Comunidad de Madrid aumentó desde 2016 hasta la pandemia del SARS-CoV2, sin embargo, las cifras postpandemia sugieren una vuelta a los valores de 2019, ii) tan sólo un 2,4% de los diagnósticos se llevaron a cabo en varones, lo cual sugiere la necesidad de fortalecer las campañas de diagnóstico en la población masculina, iii) la coinfección con *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* fue la más frecuente, siendo potenciales endobiontes de *T. vaginalis*, iv) el 2,3% de los aislados clínicos estudiados fueron resistentes al metronidazol, v) en mujeres embarazadas con tricomonosis se observaron complicaciones como rotura prematura de membranas, una mayor inflamación genitourinaria, así como coinfecciones y presencia de endobiontes, vi) el 29,1% de los aislados presentaban TVV y un 61,1% micoplasmas, con repercusiones clínicas relevantes, vii) la presencia de endobiontes no parece ser factor suficiente para condicionar la susceptibilidad farmacológica al metronidazol, viii) tras el estudio poblacional, se identifican aislados tanto del tipo 1 como del tipo 2, tendiendo el segundo a mostrar una mayor resistencia al metronidazol, ix) MLST ha resultado ser la herramienta más adecuada para realizar estudios poblacionales en aislados de *T. vaginalis*, x) con los resultados de esta Tesis Doctoral, aparecen por primera vez aislados españoles en la base de datos internacional de MLST, como segundo con mayor contribución de muestras de origen, después de EE.UU.

Celia Bolumburu Cámara  
celia.bolumburu@gmail.com

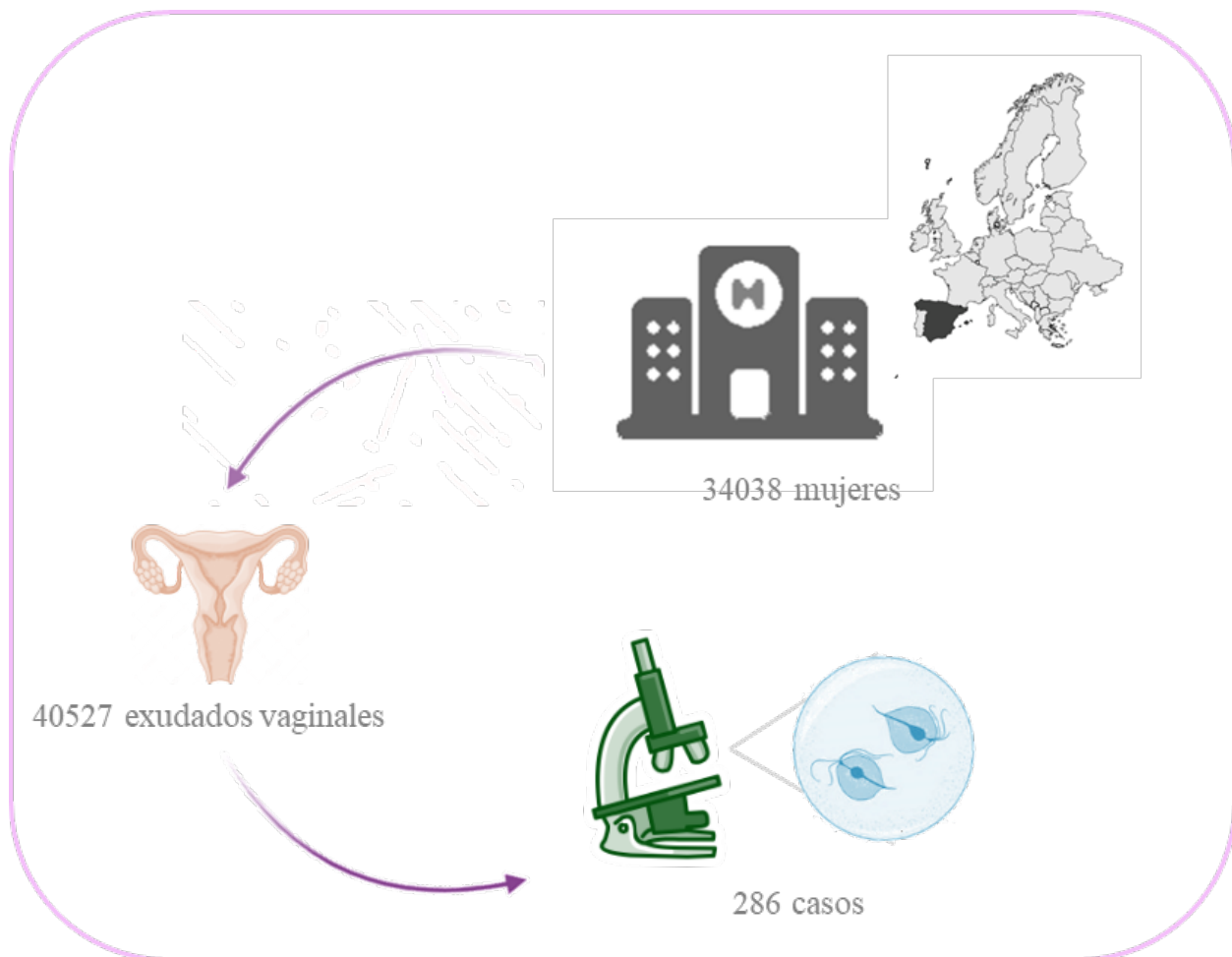
**Título de la Tesis:** *Trichomonas vaginalis*: epidemiología en un hospital terciario y caracterización biomolecular de aislados clínicos

**Autora:** Celia Bolumburu Cámara

**Directores:** Alexandra Ibáñez Escribano y José Antonio Escario García-Trevijano

**Centro de realización:** Unidad de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

**Fecha de Lectura:** 10 de julio de 2024

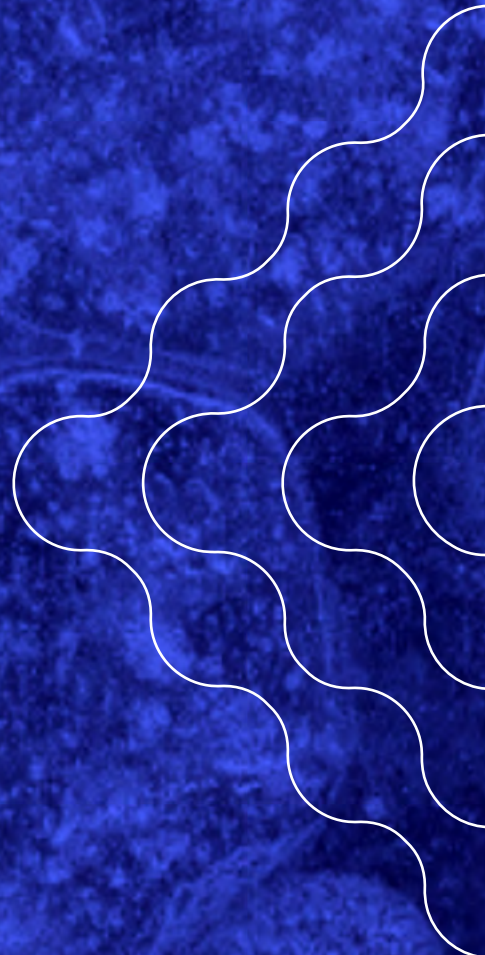


- El tratamiento de la tricomonosis durante el **embarazo** debería ser evaluado de manera individualizada, considerando los posibles riesgos asociados a la liberación de endobiontes.
- Los pacientes diagnosticados de tricomonosis deberían ser sometidos a un análisis exhaustivo en busca de **otras posibles ITS**.
- La prevalencia de la tricomonosis está infravalorada, una proporción significativa de los casos **asintomáticos** no están siendo diagnosticados.
- La incidencia de la tricomonosis diagnosticada en el hospital terciario retornó a valores pre-pandémicos en el segundo semestre de 2021, lo que sugiere una “vuelta a la normalidad”.
- El uso de **MLST** permite clasificar los aislados de *T. vaginalis* en dos poblaciones y detectar potenciales infecciones mixtas.

**Figura 1.** Principales hallazgos en la evaluación de los casos de tricomonosis diagnosticados en un hospital terciario de la Comunidad de Madrid.



# MISCELÁNEA



ANTONIO PEÑA-FERNÁNDEZ<sup>A\*,B</sup>,  
LUCRECIA ACOSTA<sup>C</sup>, JORGE GONZÁLEZ CORTES<sup>D</sup>, BESSY GUTIÉRREZ<sup>D</sup>, MARÍA ÁNGELES PEÑA<sup>E</sup>

<sup>A</sup> Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Spain; antonio.penafer@uah.es

<sup>B</sup> Leicester School of Allied Health Sciences, Faculty of Health and Life Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK.

<sup>C</sup> Área de Parasitología, Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. Valencia Km 8.7, 03550 San Juan, Alicante, Spain. lacosta@umh.es

<sup>D</sup> Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, CP 1270300, Chile. jorge.gonzalez@uantof.cl

<sup>E</sup> Unidad de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Departamento de Ciencias Biomédicas Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. angeles.pena@uah.es

# Strengthening medical parasitology education: implementing an e-Parasitology website at a Latin America university

## Abstract

The Medical Technology Department at University of Antofagasta (Chile) has incorporated the open-access virtual website e-Parasitology<sup>®</sup> (e-Parasitology<sup>®</sup> website) to strengthen the virtual teaching of medical/clinical parasitology in two healthcare programmes during the coronavirus pandemic 2019 (COVID-19) in 2020/21. Second year BSc Nursing and third year BSc Medical Technology students highly valued this intervention, as they reported learning about the specific pathology, prevention, and treatment of important worldwide parasitic diseases. Eighty percent of students from both cohorts also indicated acquisition of the competences to diagnose the infections due to these human parasites. Moreover, the results collected would suggest that e-Parasitology<sup>®</sup>, specifically its virtual microscope and library of digitized specimens, could be an appropriate (self-)learning tool to acquire time-consuming laboratory skills to identify common enteric parasites affecting Chile. Results collected also showed that the virtual website enhanced the interest of Chilean students on the study of medical and clinical parasitology, which also suggested a strengthening of the syllabus of parasitology in their respective pro-grammes to acquire a more comprehensive knowledge of this medical discipline, especially from Medical Technology students. As such, e-Parasitology<sup>®</sup> would be an appropriate virtual tool to strengthen the teaching status of parasitology to tackle important parasitic diseases.

# 1 INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic due to the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has impacted the teaching of healthcare sciences globally, enhancing the use of virtual resources to provide continuous education to learners (Al-Balas et al., 2020). Technology could aid medical education to address different challenges, including the large number of students and the shortages of healthcare professionals, to meet future requirements of the Education 2030 (Simpson et al., 2020). Future healthcare professionals will need to have specialized knowledge, understood in a broad sense, as well as appropriate skills and abilities to think beyond epistemic knowledge, so they will be able to apply their knowledge in unknown and changing circumstances to address the increasing economic and scientific developments.

Therefore, current students need to acquire a wide range of skills, attitudes, and values. Students who are better prepared for the future are agents of change and in this way they will have a positive impact on the environment, and anticipate the consequences of what they do (Ruiz Moral et al., 2022). De Montfort University (DMU, Leicester, UK) has created a series of open-access virtual resources, named e-Parasitology<sup>®</sup>, in collaboration with the Spanish Universities of San Pablo CEU and Miguel Hernandez de Elche (UMH). This international team has work closely with multimedia developers and graphic design experts from DMU (staff and undergraduate/graduated students who were hired as paid employees from a range of different funding schemes from DMU to enhance student employability, namely frontrunner, sandwich year placement and graduate champion), who were critical to build the different e-Parasitology<sup>®</sup> resources. The e-Parasitology<sup>®</sup> website is available from the DMU website (e-Parasitology<sup>®</sup> website) (Peña-Fernández et al., 2020), meanwhile the e-Parasitology<sup>®</sup> app is available from Google Store (e-Parasitology<sup>®</sup> app). Both virtual resources present innovative tools and resources for providing a holistic education of animal and medical parasitology. Thus, they present a range of up-to-date engaging virtual learning materials, exercises, and games for promoting self-learning and specific virtual clinical case studies, with mini-videos and photographs of real specimens for learning clinical parasitology diagnoses by using web-enabled devices (Peña-Fernández et al., 2020).

It is known that throughout history that the main world events have been a turning point for rapid discoveries and innovations. Therefore, since the COVID-19 pandemic, it is vitally important to know how to spread knowledge across borders, institutions and companies/industries, i.e., across all the different sectors of society. Thus, online learning technologies can play a prominent role that could tackle current and future challenges that clinical and medical teaching are facing (Alsoufi et al., 2020). As a result, academics and academic institutions should explore the effectiveness of these e-resources and virtual tools in teaching and learning, so they can be appropriately implemented in the different curricula to deliver modern and more inclusive programmes.

“Therefore, since the COVID-19 pandemic, it is vitally important to know how to spread knowledge across borders, institutions and companies/industries, i.e., across all the different sectors of society.”

Emerging data about the effectiveness of the e-Parasitology<sup>®</sup> app on learning on the participating European universities would emphasize a similar effect to that observed in cohorts that have used the website (Peña-Fernández et al., 2020). However, little is known about the effectiveness of these resources in universities from developing countries which support high morbidity/mortality indexes due to parasitic diseases, which also present different higher education (HE) systems and infrastructures that may jeopardize the effectiveness of our virtual tools. As such, we are collaborating with different universities from Chile and West Africa. We report here the Chilean experience, as a developing/emerging high-income economy.

## 1.1. CHILEAN EXPERIENCE

As of 1st October 2022, Chile has confirmed over 4.6 million cases and 61 thousand deaths to COVID-19 since the declaration of the spread of this virus as a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11th, 2020 (COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University). Following the suspension of all face-to-face teaching activities since the beginning of the pandemic (March, 2020), Chilean universities adopted a virtual teaching model using existing and/or open-access digital platforms and software (Sepulveda-Escobar et al., 2020).

In recent decades, Chile has been one of South America's fastest-growing economies, enabling the country to significantly reduce poverty and inequality (Banco Mundial, 2022). However, infections due to enteric parasites are still frequent, especially in children, with reports of 13% under 5 years that presenting with diarrhoea, and prevalence ranging between 55-76% in asymptomatic children from different areas (Ibarra et al., 2016). Common enteric parasites in Chile are *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis* and *Enterobius vermicularis* (ISPCH et al., 2012; Peña et al., 2019), which are related with inadequate health education and environmental sanitation. Chile also faces important parasitic diseases that highlight the importance of teaching medical parasitology in this country, such as cystic echinococcosis (CE) and Chagas disease (CD). CE is the leading cause of hospital admissions for parasitic diseases in Chile, with an average of 304 CE human cases reported by year (Colombe et al., 2017). CD is a public health problem in the country that has shown an increment in cases since 2016 (1611 cases) to 2019 (2333 cases) (ISPCH, 2019).

“Chilean universities adopted a virtual teaching model using existing and/or open-access digital platforms and software (Sepulveda-Escobar et al., 2020).”

The Department of Medical Technology at the Chilean University of Antofagasta, incorporated the e-Parasitology® package on two healthcare programmes to aid with the virtual teaching of (clinical) parasitology in 2020/21 as well as strengthening their virtual provision. The specific programmes that used our website were the BScs of Nursing and Medical Technology.

## 2 INTRODUCTION

The aims of this manuscript are to explore the impact and effectiveness of e-Parasitology® for teaching clinical parasitology at a South American university, as a potential virtual teaching and learning tool to strengthen education on this discipline from a One Health point, which could also contribute to the implementation of “Una Salud Chile”, initiative which started in 2014 in Chile (Pettan-Brewer et al., 2021).

## 3 TEACHING RESOURCES AND METHODS

The e-Parasitology® website was used in the following modules: the 2nd semester module (equivalent to a 1st year module in the European HE model) of Microbiology and Parasitology at the BSc Nursing (syllabus available online; Nursing programme website), and the 5th semester module (third year module) of Clinical Parasitology at the BSc Medical Technology (Medical Technology programme website; clinical molecular bioanalysis, haematology and transfusion medicine route), respectively.

The methods used to test the resources created were like those previously described by our team elsewhere (Peña-Fernández et al., 2020), with some improvements to study acquisition of knowledge. Briefly: students enrolled in both modules were provided with an overview of the e-Parasitology® website at the beginning of the course on week commencing on the 19th of October 2020, together with a short introduction to the project. At the end of this introductory session, students were asked to voluntarily complete an online short questionnaire (named part A) with different questions around them and their experience with parasitology, in addition to a few basic MCQ questions around general medical parasitology to record their background. Following this introductory session, students attended their timetabled lectures and practicals, which were entirely delivered online using the Zoom™ Video Communication Inc. platform in combination with Moodle as the learning management system to upload and share the recorded laboratory materials with students due to the COVID-19 pandemic. This mixed method has been adopted in other universities with very positive outcomes (Correia et al., 2020; Fatani et al., 2020; Vandenberg et al., 2021). Throughout the modules, students were signposted to the specific/relevant resources available in the virtual package. At the end of both modules, students were asked to resolve the two virtual medical parasitology case studies available in the website and voluntarily complete a specific feedback-questionnaire, with MCQs around the parasites covered in the case studies, to investigate the potential effect of virtual resource on the acquisition of knowledge.

Ethical approval was provided by the Research Ethics Committee at DMU (Ref. 1851; 8th December 2016; amendment approved on 8th October 2019) and the University of Antofagasta, which was appropriately informed about this project. In addition, written approval from participants was obtained in each electronic questionnaire, which were collected at DMU. Moreover, responders created anonymous IDs at the beginning of each questionnaire, so they could be paired for appropriate processing. Data were analysed descriptively using Microsoft Excel (Version 16.57, Redmond, WA, USA).

## 4 RESULTS AND DISCUSSION

Although all 25 Medical Technology students (Table 1) reported having studied parasitology before (as they have a Basic Parasitology module in the previous semester), 32% and 8% reported having a poor or fair knowledge of this discipline, respectively, which might highlight the importance of our intervention as e-Parasitology® could be used as a learning support resource for these students. In contrast, only six Nursing students out of 29 reported studying aspects of this discipline before, with a 65.5% of them indicating to have a poor knowledge of parasitology.

Programme	Sex	Part A	Part B
Nursing	Male	3	0
	Female	26	5
Medical Technology	Male	6	5
	Female	19	10
<b>Total</b>		<b>54</b>	<b>20</b>

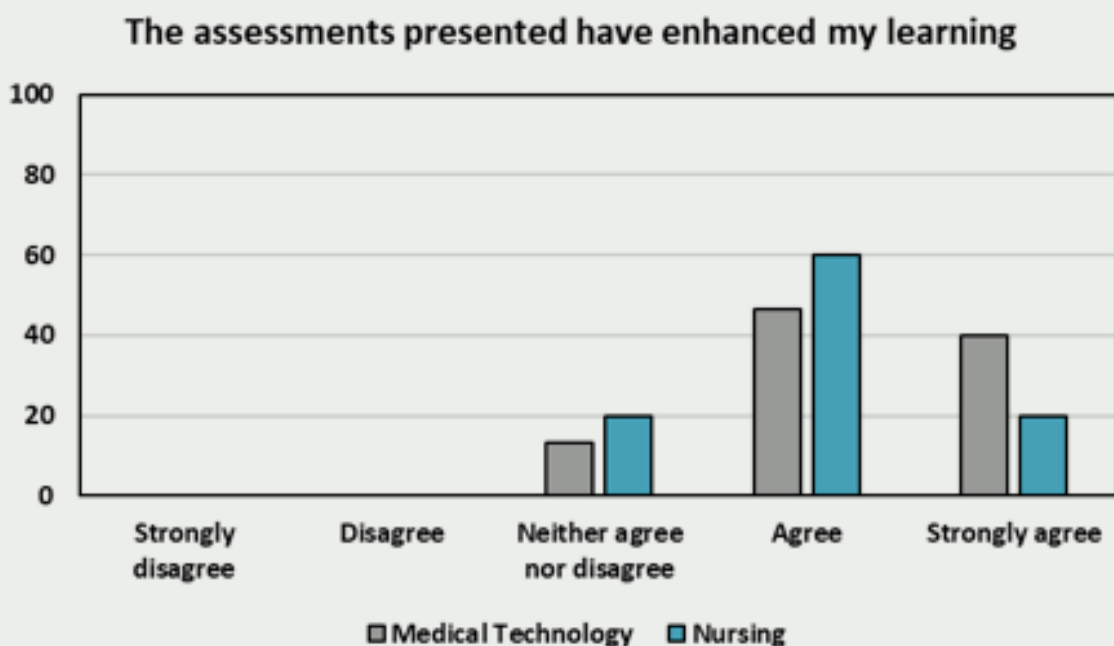
Table 1. Students' responses according to sex and programme.

We were unable to statistically compare the results obtained in the MCQs between both parts due to the low number of responses recorded in part B (Table 1) owing to different reasons, as follows. This might be attributed to different causes including completion of both questionnaires being voluntarily, and the minimal interest shown by students in both degrees in medical parasitology, particularly nursing students. Moreover, it was the first time that these students used a virtual environment like e-Parasitology<sup>®</sup> for their learning and were involved in a teaching innovation project, which perhaps might have aided to their low engagement in the teaching activity implemented.

Nine Medical Technology students that completed part B of the questionnaire at the end of the course indicated that they frequently used e-Parasitology<sup>®</sup> to aid with the study of the Basic Parasitology module (44% sometimes, 33% often, 22% always), with most of them reporting the use of the virtual microscope with the digitised clinical samples to study the characteristics of helminths' eggs (*Ascaris lumbricoides*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp.) and protozoan (*Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *G. intestinalis*) parasites for diagnoses that are common in Chile. Interestingly, these parasites are not described in the virtual medical case studies, which might suggest that the website would be a potential self-learning tool to learn to microscopically identify parasites in the laboratory. In contrast, only one Nursing student reported using our virtual website for the study of their specific module.

#### 4.1. STUDENTS' OPINIONS AND FEEDBACK ON THE VIRTUAL PACKAGE

Following the completion of the virtual medical parasitology case studies, most students indicated acquisition of knowledge on the pathology, prevention and treatment of the parasitic diseases studied (specifically those studied in the case studies, *i.e.* malaria, *Schistosoma* spp., *Entamoeba histolytica* & free-living amoebas) (Box 1). In general, Medical Technology students reported better levels of acquisition of knowledge, which could be attributed to the fact that they studied parasitology previously. Surprisingly, 40% nursing students were unsure about learning of the treatment of these parasitic diseases, although the low number of responses collected (n=5) makes this result uncertain. Moreover, a high percentage of participants (80%) reported learning the necessary competences to diagnose these important diseases, which are key for these future healthcare professionals. This result would be aligned with participants' response about the use of the virtual microscope and the high value that they provided to this e-Parasitology<sup>®</sup> tool, which would be in line with those observed in Spanish Pharmacy students at UMH (Peña-Fernández et al., 2020).



## The knowledge learned in parasitology will help me in my future career

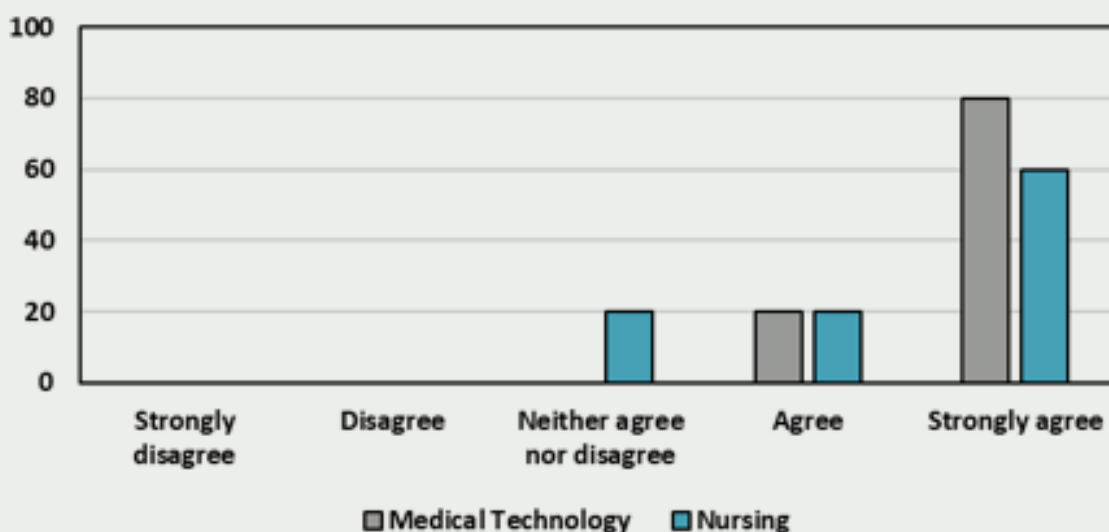
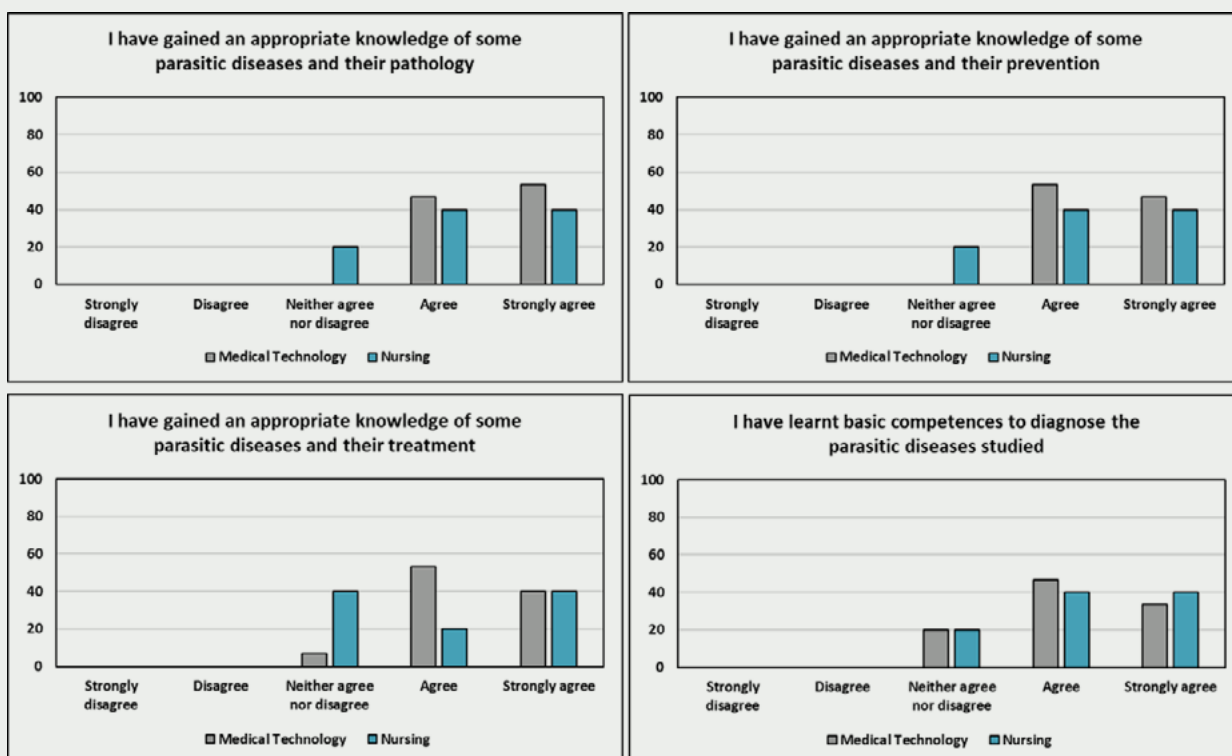


Figure 1. Students' opinion on their impact of using e-Parasitology<sup>®</sup> (data presented as percentages).

Participants, particularly Medical Technology students, highly valued this acquisition of knowledge, as they consider that will help their future career (Figure 1). Thus, all Medical Technology responders recommended the strengthening of the parasitology content in their curriculum (73.3% agree, 26.7% strongly agree). Contrarily, 40% Nursing students were unsure about increasing the parasitology content in their programme, which could be attributed to the lower relevance that they provide to this discipline (20% participants were unsure if learning parasitology will help their careers; Figure 1), maybe because they study parasitology in the first year with little previous background. This might have also contributed to the poor engagement with the completion of the voluntary questionnaires recorded. Finally, participants from both cohorts reported that the different formative assessments and mini-quizzes presented within the theoretical units for promoting self-learning enhanced their learning (Figure 1), which would be also in agreement with those reported in UMH students. This result would also highlight the relevance of e-Parasitology<sup>®</sup> as a useful resource for facilitating self-learning in undergraduate students that study general (Nursing) or more specialized parasitology (Medical Technology).

Today, many universities have recognized the importance of e-learning as a central element of their teaching and learning systems, which includes self-learning as well as formative/summative assessment. Therefore, more research investment has been used to understand the difficulties, advantages, and challenges of on-line and virtual learning in higher education. However, developing countries face many challenges in the application of e-learning education, which might put their educational institutions and systems at a disadvantage for the future of education, challenges that should be tackled to minimize or reduce current gaps. These challenges include that any student seeking to enroll in an e-learning program would need to invest a significant amount of money in a range of resources, including access to appropriate equipment (e.g. laptop, tablet, Smartphone), secure access to a reliable/robust internet/data connection, and account with initial knowledge on the use of technological means to obtain, understand and learn electronic/virtual information provided.



BOX 1. Students' opinion on their acquisition of knowledge and competences by using e-Parasitology® (data presented as percentages).

## 5 CONCLUSIONS

Although our results should be considered as preliminary, the e-Parasitology® website has been shown to be a potential learning tool to study important human parasites, not only from a theoretical point of view such as prevention and treatment, but also to learn laboratory competences for diagnoses at a Latin America university. This website could also be useful to aid with the teaching of time-consuming parasitology skills, including microscopic analysis for diagnoses, which are difficult to appropriately provide in healthcare programmes as they have very little time available and/or limitations on the availability of resources.

### Author Contributions

Conceptualization, APF; methodology, APF, LA, MAP; software and re-sources, APF, DMU; implementation, APF, JGC, BG; formal analysis, APF, LA, JGC, BG, MAP; data curation, APF, JGC, BG, MAP; investigation, APF, LA, MAP; writing—original draft preparation, APF; writing—review and editing, APF, LA, JGC, BG, MAP; project administration, APF; funding acquisition, APF. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Acknowledgments

The authors would like to express their sincere appreciation to Maksymilian Szymulewicz and Joshua Simons (2018-19 and 2019-20 DMU sandwich placement students, re-spectively), for production of different artworks and multimedia resources for the e-Parasitology® project. The authors also acknowledge support from the Faculty of Health & Life Sciences and DMU for access to critical resources, including software licenses and computing facilities, and to the Chilean University of Antofagasta, for facilitating the development of this project. Moreover, the authors would like to express their sincere appreciation to Dr Mark D. Evans (DMU), for proof reading.

## 6 REFERENCES

1. Al-Balas, M., Al-Balas, H. I., Jaber, H. M., Obeidat, K., Al-Balas, H., Aborajoo, E. A., Al-Taher, R., Al-Balas, B. Distance learning in clinical medical education amid COVID-19 pandemic in Jordan: current situation, challenges, and perspectives. *BMC Med. Educ.* 2020, 20(1), 341-347.
2. Alsoufi, A., Alsuyhili, A., Msherghi, A., Elhadi, A., Atiyah, H., Ashini, A., Ashwieb, A., Ghula, M., Hasan, H.B., Abdabuos, S., Alameen, H., Abokhdhir, T., Anaiba, M., Nagib, T., Shuwayyah, A., Benothman, R., Arrefae, G., Alhadi, A., Zaid, A., Elhadi, M. Impact of the COVID-19 pandemic on medical education: Medical students' knowledge, attitudes, and practices regarding electronic learning. *Plos One* 2020, 15(11), e0242905.
3. Banco Mundial, 2022. <https://www.bancomundial.org/es/country/chile/overview> [15 May 2024].
4. Colombe, S., Togami, E., Gelaw, F., Antillon, M., Fuentes, R., Weinberger, D. M. Trends and correlates of cystic echinococcosis in Chile: 2001-2012. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2017, 11(9), e0005911. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005911
5. Correia, A., Liu, C., Xu F. Evaluating videoconferencing systems for the quality of the educational experience. *Distance Educ.* 2020, 41, 4, 429-452. DOI: 10.1080/01587919.2020.1821607
6. Fatani, T.H. Student satisfaction with videoconferencing teaching quality during the COVID-19 pandemic. *BMC Med. Educ.* 2020, 20, 396-403.
7. Ibarra, C., Herrera, V., Pérez de Arce, E., Gil, L. C., Madrid, A. M., Valenzuela, L., Beltrán, C. J. Parasitosis y síndrome de intestino irritable. *Rev. Chilena Infectol.* 2016, 33(3), 268-274.
8. ISPCH (Instituto de Salud Pública de Chile). Vigilancia de diarreas por agentes parasitarios en menores de 5 años Chile 2008-2012. *Boletín Instituto de Salud Pública*, vol 2, No. 11, 2012.
9. ISPCH (Instituto de Salud Pública de Chile). Vigilancia de laboratorio de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Chile, 2012 – 2019. *Boletín Instituto de salud pública*, vol 10, No. 9, 2020.
10. Peña, S., Carrasco, G., Rojas, P., Castillo, D., Ozaki, L. S., Mercado, R. Determination of subtypes of *Blastocystis* sp. in Chilean patients with and without inflammatory bowel syndrome, A preliminary report. *Parasite Epidemiol. Control* 2019, 8, e00125.
11. Peña-Fernández, A., Acosta, L., Fenoy, S., Magnet, A., Izquierdo, F., Bornay, F.J., Ollero, MD., Hurtado, C., del Águila C. Evaluation of a novel digital environment for learning medical parasitology. *High. Educ. Pedag.* 2020, 5(1), 1-18.
12. Pettan-Brewer, C., Martins, A. F., de Abreu, D., Brandão, A., Barbosa, D. S., Figueroa, D. P., Cediel, N., Kahn, L. H., Brandespim, D. F., Velásquez, J., Carvalho, A., Takayanagui, A., Galhardo, J. A., Maia-Filho, L., Pimpão, C. T., Vicente, C. R., Biondo, A. W. From the Approach to the Concept: One Health in Latin America-Experiences and Perspectives in Brazil, Chile, and Colombia. *Front. Public Health* 2021, 9, 687110.
13. Ruiz Moral R, García de Leonardo C, Caballero Martínez F, Monge Martín D. Medical students' attitudes toward communication skills learning: comparison between two groups with and without training. *Advances in Medical Education and Practice.* *Advances in Medical Education and Practice* 2022, 13 (10), 1367–1374.
14. Sepulveda-Escobar, P. Morrison, A. Online teaching placement during the COVID-19 pandemic in Chile: challenges and opportunities. *Eur. J. Teach. Educ.* 2020, 43:4, 587-607.
15. Simpson, D., Sullivan, G. M., Artino, A. R., Jr, Deiorio, N. M., Yarris, L. M. Envisioning Graduate Medical Education in 2030. *J. Grad. Med. Educ.* 2020, 12(3), 235–240.
16. Vandenberg, S., Magnuson, M. A comparison of student and faculty attitudes on the use of Zoom, a video conferencing platform: A mixed-methods study. *Nurse Educ. Pract.* 2021, 54, 103138.

Paul Nguewa

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdisNA),  
Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, España  
panguewa@unav.es

# “PARÁSITOS. LOS ACTORES SECUNDARIOS EN NUESTRA HISTORIA”



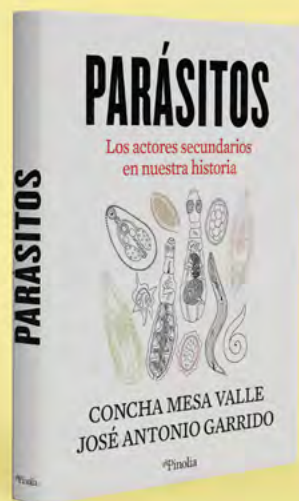
## Reseña del libro:

**C**oncha Mesa Valle y José Antonio Garrido Cárdenas, profesores del Área de Parasitología de la Universidad de Almería y miembros de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), son autores del magnífico libro titulado “Parásitos. Los actores secundarios en nuestra historia” publicado con Editorial Pinolia.

Según estos autores, los parásitos son un grupo de organismos que había aprendido a vivir, de manera temporal o permanente, dentro o sobre otro ser vivo (el hospedador) y la adaptabilidad de los parásitos es parte de la historia de una relación compleja.

En este libro de divulgación científica de lectura ágil, estos dos miembros de la SOCEPA conjugan conocimiento biomédico, rigor científico y entretenimiento.

En uno de los capítulos más originales, los doctores Mesa y Garrido mencionan evidencias científicas acumuladas en las últimas décadas y que ponen de manifiesto la capacidad de algunos parásitos para manipular el comportamiento del hospedador.



Este libro facilita para los lectores no solamente una adecuada comprensión de los parásitos y sus vectores, pero también una visión científicamente más rigurosa.

Estos profesores resaltan el papel de los vectores en la epidemiología de las enfermedades parasitarias, en su distribución geográfica.

Los autores de “**Parásitos. Los actores secundarios en nuestra historia**” mencionan la malaria denominada enfermedad de los pantanos y los avances científicos logrados para encontrar fármacos eficaces contra esta parasitosis y que han sido especialmente reconocidos hace una década (Premio Nobel de Medicina, 2015).

Además, **Concha Mesa** y **José Antonio Garrido** no se resisten a detallar en su libro información sumamente relevante sobre los parásitos en el agua y del suelo, así como sobre los parásitos en el pescado y la carne.

Como enfatizan los autores, los artrópodos, los parásitos de las mascotas entre otros no pueden desligarse del concepto “One Health”. Al leer estos capítulos, los lectores perciben con mayor claridad las conexiones existentes.

El libro concluye con unas perspectivas futuras. En efecto, los parásitos plantean nuevos retos sanitarios y veterinarios a los científicos de todo el mundo. Entre los desafíos actuales y los objetivos a alcanzar, los profesores Mesa y Garrido mencionan la ausencia de vacunas, la aparición de resistencia a los tratamientos, la emergencia de zoonosis, la promoción de la educación sanitaria, la implementación de medidas de control de vectores, la mejora de higiene y seguridad alimentaria.

Este libro es sin duda una obra imprescindible para los amantes de la parasitología y nos recuerda con elegancia y rigor científicos que la salud no es algo aislado. Existe una única salud (*One Health*) que engloba a la salud humana, animal y la de los ecosistemas: la salud de nuestro planeta.

“ El libro concluye con unas perspectivas futuras. En efecto, los parásitos plantean nuevos retos sanitarios y veterinarios a los científicos de todo el mundo. ”



# CONCURSO DE FOTOGRAFÍA XXIII CONGRESO SOCEPA 2024

“ *La Sociedad Española de Parasitología concedió dos PREMIOS A LA MEJOR FOTOGRAFÍA en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, celebrado en Sevilla los días 2, 3, 4 y 5 de septiembre de 2024.* ”

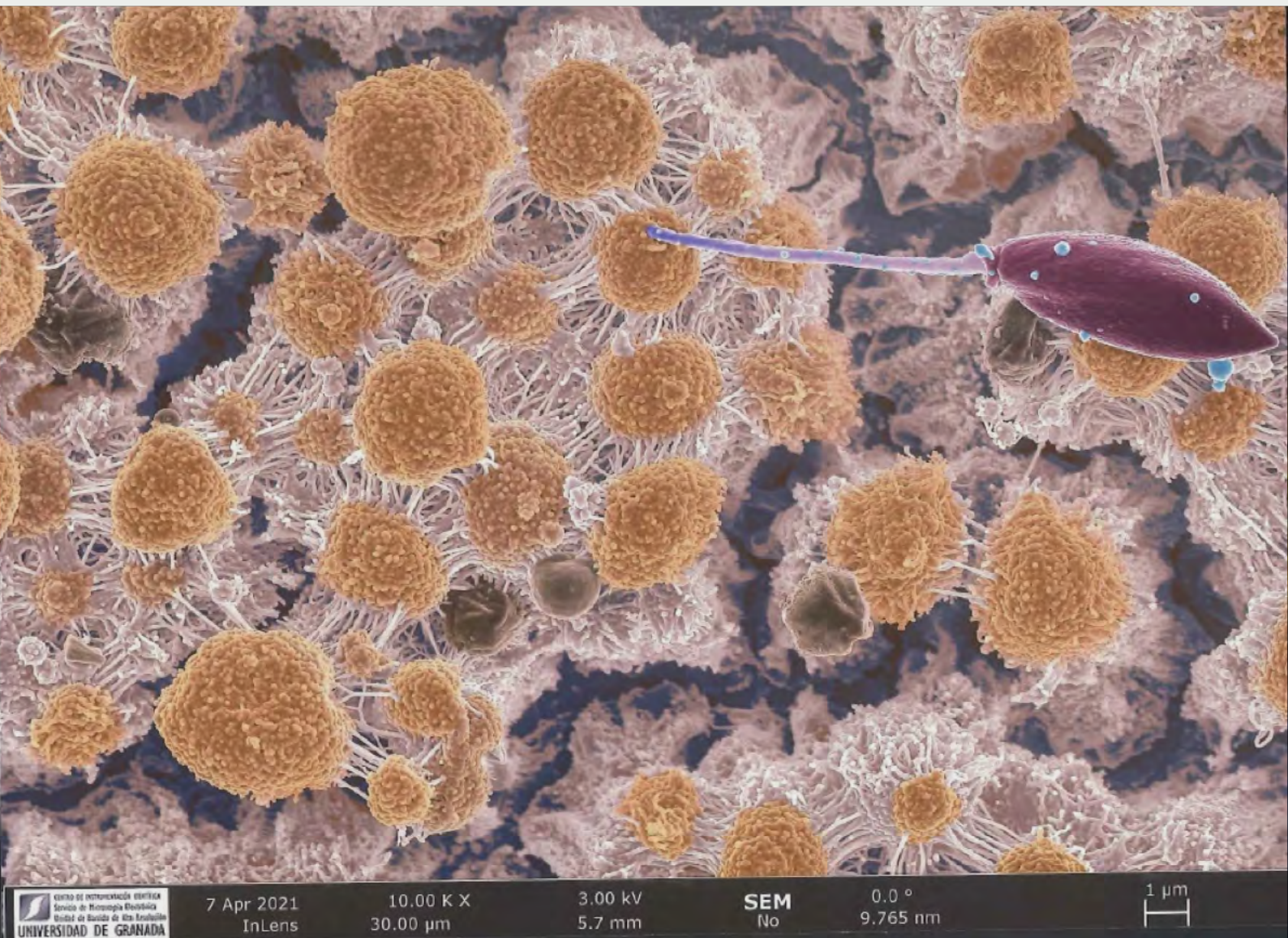
## Los ganadores de los premios fueron ex aequo:

**D**olores Molina Fernández, Pedro García Olmedo, Jessica Carreira de Paula y Luis Miguel de Pablos Torró bajo el pseudónimo “*Cazadores de tripanosomas*”, con la fotografía titulada “*Imagen pseudocoloreada de microscopía electrónica de barrido de biofilms in vitro de Lotmaria passim*” y Daniel Bravo Barriga y Mikel Alexander González de Heredia bajo el pseudónimo “*El observador*”, con la fotografía titulada “*Miradas mirantes*”.



# PREMIO A LA MEJOR FOTOGRAFÍA

(XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, Sevilla, septiembre de 2024)



**Título:** Imagen pseudocoloreada de microscopía electrónica de barrido de biofilms *in vitro* de *Lotmaria passim*.

**Autores:** Dolores Molina Fernández, Pedro García Olmedo, Jessica Carreira de Paula y Luis Miguel de Pablos Torró

**Pseudónimo:** Cazadores de tripanosomas.



# PREMIO A LA MEJOR FOTOGRAFÍA

(XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, Sevilla, septiembre de 2024)



**Título:** Miradas mirantes.

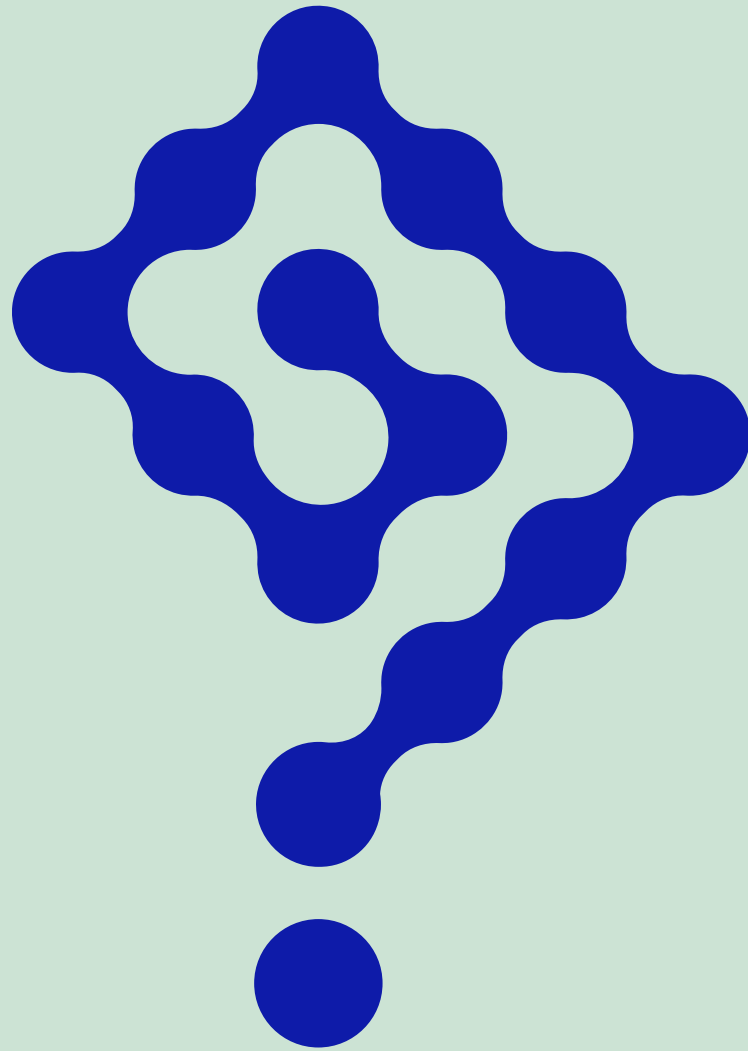
**Autores:** Daniel Bravo Barriga y Mikel Alexander González de Heredia.

**Pseudónimo:** El observador.

# ParaJournal

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE PARASITOLOGÍA · **SOCEPA**

2025  
Num. 7



**ESTAMOS PREPARANDO EL  
PRÓXIMO NÚMERO DE PARAJOURNAL.  
CONSULTA NUESTRAS NORMAS  
DE PUBLICACIÓN Y PARTICIPA.**

# ParaJournal

## NORMAS DE PUBLICACIÓN

La revista "PARAJOURNAL", es una revista que considerará para su publicación aquellos trabajos de investigación, revisión y opinión del ámbito de la Parasitología aprobados por la SOCEPA.

### **ENVÍO DE ORIGINALES**

Los manuscritos deben procesarse en Word y remitirse por vía electrónica a la/el Secretaria/o de la SOCEPA.

### **PROCESO DE REVISIÓN EDITORIAL**

La correspondencia con los autores se realizará por correo electrónico. Se acusará recibo de los trabajos enviados e informará acerca de su aceptación.

A continuación, el Comité Editorial remitirá las sugerencias y las indicaciones oportunas y los plazos para que se ajusten al formato de la revista.

### **REVISIÓN DE PRUEBAS**

El autor recibirá unas pruebas por correo electrónico, que deberá devolver corregidas antes de 72 horas. Estas pruebas tienen por objeto detectar errores tipográficos, ortográficos o de forma. No se aceptarán correcciones que afecten al contenido o que modifiquen el artículo en su sentido original.

### **COMITÉ EDITORIAL**

El Comité Editorial está formado por el/la Presidente, el/la Secretario/a, los miembros de la Junta Directiva y los Presidentes anteriores.

### **CONTENIDOS:**

#### ***Editorial***

Realizado por el actual o los sucesivos Presidentes anteriores. La extensión máxima recomendada del texto será de 300 palabras.

#### ***Sección 1. Historia de la Parasitología***

Será coordinada por los Profesores Francisco Rojo Vázquez y Antonio R. Martínez Fernández. Se publicarán artículos relacionados con la Historia de la Parasitología en formato libre tras su revisión y aceptación por los coordinadores de la sección.

## **Sección 2. Revisiones amplias**

En esta sección se publicarán revisiones bibliográficas (antecedentes, introducción, etc.) de Tesis Doctorales en el ámbito de la Parasitología defendidas en años anteriores.

También se publicarán Trabajos de Fin de Máster y Trabajos de Fin de Grado de contenido bibliográfico. No se exige ningún formato especial de estilo en el texto ni en las referencias bibliográficas. Tampoco hay límite de extensión.

Los trabajos irán encabezados por el título de la Revisión en negrita, seguido del nombre del autor, centro de trabajo y la dirección para la correspondencia incluyendo el correo electrónico. A continuación figurará el título de la Tesis (TFM o TFG), Director(es)/Tutor(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y fecha de lectura.

## **Sección 3. Investigaciones breves**

En esta sección se publicarán resúmenes de Tesis Doctorales, así como TFM y TFG de contenido experimental. También se incluirán resúmenes de congresos y artículos publicados con indicación de su procedencia.

Los resúmenes de Tesis, TFM y TFG experimentales seguirán el siguiente formato: Título, Autor, email de contacto, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto), fecha de lectura y Resumen. La extensión máxima recomendada del texto será de 1000 palabras, con letra Times New Roman, tamaño 12 puntos e interlineado sencillo (Introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados, discusión y conclusiones). Se aceptarán un máximo de 2 entre la suma de tablas y figuras sin referencias bibliográficas.

En el caso de comunicaciones a congresos o artículos publicados deben incluir la siguiente información: Título de la reseña, Autor, email de contacto, referencia bibliográfica completa del artículo que se reseña y Resumen (máximo, 800 palabras y 2 figuras/tablas) con letra Times New Roman, tamaño 12 puntos e interlineado sencillo sin referencias bibliográficas.

## **Sección 4. Miscelánea**

Se publicarán artículos en formato libre sobre parásitos y viajes, parásitos y arte, parásitos y literatura, parásitos y cine o cualquier otro campo de interés en Parasitología.

También se incluirán reseñas de libros, artículos relevantes u otros materiales considerados interesantes para docencia y/o investigación (entrevistas, dossiers científicos,...). En esta sección también se incluirán todas las referencias que aparezcan en la sección PARAOPINAR.

## NORMAS DE ESTILO

# La metabolómica basada en espectrometría de masas como herramienta en parasitología.

JUAN MARTÍN MARTÍN <sup>1-2</sup>  
RUBÉN CASTELL <sup>1</sup>

1. Universitat de València. Valencia, España  
2. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia

Las moléculas pequeñas de origen biológico desempeñan múltiples funciones esenciales, destacando aquellas metabólicas, estructurales y de señalización celular.

El metaboloma es estudiado de manera holística mediante el uso de plataformas de análisis metabolómico y especialmente mediante técnicas de separación acopladas a espectrometría de masas.

Éstas han sido empleadas con éxito en numerosos aspectos de la parasitología, tales como profundizar en la patogénesis de una enfermedad determinada, identificar biomarcadores diagnósticos y pronósticos.

“Cita  
resaltada  
del autor”

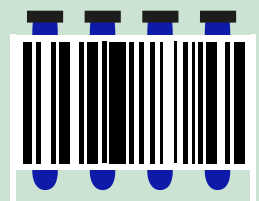
En esta mesa redonda, se presenta una visión panorámica acerca de las áreas más estudiadas, así como posibles nichos en donde la comunidad parasitóloga puede beneficiarse del uso de estas técnicas. Se expondrán desde un punto de vista crítico aquellos aspectos clave, ventajas y limitaciones a considerar en el experimento metabolómico tanto generales como específicos en parasitología, ejemplificando con dos estudios de metabolómica no dirigida realizados en nuestro centro (CEMBIO) en modelos de infección *in vitro* por *Leishmania donovani* y *Babesia divergens*.

KEYWORDS: Schistosomiasis, Diagnostics, QPCR, ELISA.

1. Los textos se enviarán con letra Times New Roman, tamaño 12 puntos e interlineado sencillo, marcando únicamente los saltos de párrafo. Sin estilos y manteniendo este esquema.
2. Los títulos de las publicaciones en formato frase, sin mayúsculas.
3. Los términos originales en latín, escritos en letras cursiva con la primera letra en mayúscula.
4. En caso de querer remarcar una cita del autor fuera del párrafo, se incluirá separada al final del texto con el título: “Cita del autor”

SIGUE TODA LA ACTIVIDAD  
DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA  
DE PARASITOLOGÍA EN

**socepa.org**



ISSN: 2951-8741