



Identificación de subtipos de *blastocystis* sp asociados a fuentes de transmisión en una zona rural del departamento del Quindío.

Identification of *blastocystis* sp subtypes associated to transmission sources in a rural area of the department of Quindío.

Laura Sierra R.¹, Gloria Deicy Muñoz S.¹, Fabiana María Lora S.^{1*}, Jorge Enrique Gomez M.¹

¹. Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, COL

Recibido: Agosto 30 de 2023

Aceptado: Diciembre 10 de 2023

*Correspondencia del autor: Fabiana María Lora S

E-mail: flora@uniquindio.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i35.292>

Resumen

Introducción. *Blastocystis* sp es un protozoo parásito que se encuentra en el tracto intestinal del hombre y algunos animales, se estima que infecta a más de 1.000 millones de personas en el mundo. El presente trabajo tuvo como **Objetivo** determinar los genotipos de *Blastocystis* sp asociados a diferentes fuentes de transmisión en zona rural del departamento del Quindío. **Materiales y Métodos.** Se obtuvieron 42 muestras coprológicas de niños entre 0 y 14 años, 17 de heces de animales, 17 de alimentos, 28 de superficies inertes, 15 de suelo, 18 de agua de red domiciliaria y 3 de fuente hídrica. Se realizó extracción de ADN y amplificación por PCR para *Blastocystis* sp usando como blanco el gen SSADNr. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW y se realizaron árboles filogenéticos el programa (MEGA11). **Resultados.** De las 140 muestras recolectadas entre coprológicas de población infantil y matrices ambientales, se encontró una prevalencia de *Blastocystis* sp del 23,5 % en alimentos, 22,2% en red domiciliaria y del 4,75 % en la población infantil, no hubo evidencia estadística que implicara una asociación entre la presencia de este protozoo y las variables sociodemográficas. Se encontró el subtipo 2 asociado a población infantil y el subtipo 3 asociado a matrices ambientales (agua y alimentos) y población infantil. **Conclusiones:** Se reporta la presencia de *Blastocystis* sp en tomate y zanahoria, en la red domiciliaria y población infantil en una zona rural del departamento del Quindío donde los subtipos asociados fueron el subtipo 2 y 3.

Palabras clave: Alimentos, Genotipos, Infecciones, Infantil, Matrices, Protozoo.

Abstract

Introduction. *Blastocystis* sp is a parasitic protozoan found in the intestinal tract of man and some animals, and it is estimated that it infects more than 1,000 million people in the world. In the national parasitism survey, it was reported with a prevalence of 52% in the northern Andean region. The aim of this study was to determine the genotypes of *Blastocystis* sp associated with different sources of transmission in rural areas of the department of Quindío. **Materials and Methods.** Forty-two coprological samples were obtained from children between 0 and 14 years of age, 17 from animal feces, 17 from food, 28 from inert surfaces, 15 from soil, 18 from household water and 3 from water sources. DNA extraction and PCR amplification were performed for *Blastocystis* sp using the SSADNr gene as target. The sequences were aligned with ClustalW and phylogenetic trees were performed with the program (MEGA11). **Results.** Of the 140 samples collected between coprological samples of children and environmental matrices, we found a prevalence of *Blastocystis* sp of 23.5% in food, 22.2% in the home network and 4.75% in the child population, there was no statistical evidence implying an association between the presence of this protozoan and sociodemographic variables. Subtype 2 was found associated with infant population and subtype 3 associated with environmental matrices (water and food) and infant population. **Conclusions:** We report the presence of *Blastocystis* sp in tomato and carrot, in the home network and infant population in a rural area of the department of Quindío where the associated subtypes were subtype 2 and 3.

Keywords: Food, Genotypes, Infections, Infant, Matrices, Protozoa

Introducción

Las infecciones intestinales causadas por parásitos, son un problema de salud pública a nivel mundial pues más de dos millones de personas se encuentran infectadas; siendo los niños de 5 a 14 años los principales grupos de riesgo (1). *Blastocystis* spp. es un protozoo parásito cosmopolita que habita en el tracto intestinal de humanos y de numerosos animales. Se estima que afecta a más de 1.000 millones de personas en el mundo y su prevalencia es más alta en países en vía de desarrollo asociado con las condiciones de saneamiento deficiente, contacto con animales, consumo de alimentos o agua contaminados y malnutrición (2). El hallazgo de este parásito en heces de diversas especies animales sugiere su potencial zoonótico (3).

En la encuesta nacional de parasitismo realizada entre el 2012 y 2014 se encontró que el protozoo patógeno intestinal más prevalente en todas las provincias biogeográficas fue *Blastocystis* spp con una prevalencia del 52% exactamente en la provincia norandina (4). A pesar de su elevada frecuencia, ha estado inmerso en controversias y numerosas revisiones por su taxonomía, características morfológicas, ciclo de vida y papel patógeno,

que siguen sin ser concluyentes y en ciertos casos resultan contradictorios; Algunos autores han encontrado una asociación con trastornos intestinales como diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal síndrome del intestino irritable, y manifestaciones extraintestinales de la colitis como urticaria y la anemia ferropénica. Otros, por el contrario, lo encuentran en proporciones iguales en pacientes sintomáticos y asintomáticos, lo que genera debate sobre su papel como patógeno o comensal (5). A la fecha aún quedan aspectos desconocidos de este protozoo, por tal motivo no ha sido aceptado por todos los autores propiamente como agente causante de enfermedades diarreicas pues sigue siendo objeto de debate, pero ahora está claro que algunos subtipos están relacionados con síntomas en humanos (6).

En los años noventa se reportó una prevalencia de 1,5 a 10 % en países desarrollados (parásito más frecuente en los EE. UU.) y 30 a 50 % en países en vía de desarrollo, datos reportados en pacientes sintomáticos como asintomáticos (7). En Argentina investigaciones realizadas sobre la asociación de factores ambientales y parásitos intestinales han permitido obtener resultados que evidencian una prevalencia del 45,4%, donde

el parásito más prevalente fue *Blastocystis* sp. con una frecuencia de 27,2% , el suelo con un 82,3% y el agua con un 84,2% los cuales estuvieron relacionados con las deficientes condiciones sanitarias (8).

Actualmente existen diferentes estudios para Colombia que se centran en la identificación de los subtipos de *Blastocystis* sp en heces de humanos mayormente de niños (9). Para Medellín fue reportada una prevalencia de *Blastocystis* por PCR del 53,2% (141/265), los subtipos identificados fueron ST3 en un 30,5% (18/59), ST2 en un 23,7% (14/59), ST1 en 20,3% (12/59), y con menor frecuencia, ST4 en 5,1% (3/59), ST6 en 1,7% (1/59) y ST16 con un 15,3% (9/50) (10).

En un estudio realizado en Apulo, Colombia se reportó una prevalencia del (72,4%) para *Blastocystis*, (71/98) y la NGS (Next Generation Amplicon) reveló la presencia de cinco ST (ST1-ST5), siendo ST1, ST2 y ST3 las más comunes y presentándose en proporciones casi iguales, también fue frecuente la presencia de ST mixtos en la misma muestra (28,2%) (11). Para Ibagué en el año 2020 se obtuvo un reporte en muestras fecales humanas revelando la diversidad genética de subtipos: ST1 50%, ST2 33% y ST3 17% (12). En Armenia se realizó un estudio en población infantil reportando una prevalencia del 28% (40/138) para *Blastocystis* sp, con una asociación entre el subtipo 2 con presentar síntomas, así como entre el subtipo 1 y 3 y personas asintomáticas (13). Estos estudios han utilizado para la detección del ADN de *Blastocystis* sp del gen de la SSARNr que se encuentra altamente conservado; la diversidad genética de este organismo también se ha demostrado mediante el análisis de los patrones de RFLP (polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción) obtenidos del gen de la ssARNr y del factor de elongación EF-1 α (14).

En Colombia y en la mayoría de los países de Suramérica, pocos estudios han buscado determinar las ST

circulantes en animales (15). Sin embargo, los datos actuales indican que los animales pueden albergar subtipos potencialmente zoonóticos y podrían desempeñar un papel en la transmisión de *Blastocystis* a los humanos (16).

Dado que los estudios previos se enfocan en estimar la prevalencia en la población humana y su relación con animales domésticos, o estudios de una sola matriz ambiental, pero no hay reportes donde se identifiquen diferentes matrices ambientales en un mismo estudio y zona geográfica, el objetivo de la investigación fue identificar la presencia de subtipos de *Blastocystis* en muestras de matrices ambientales y en muestras de heces de niños de edad escolar en una zona rural del departamento del Quindío Colombia.

Metodología

Tipo de estudio. Se realizó un estudio de tipo descriptivo con un enfoque epidemiológico.

Lugar y tamaño de la muestra. Se seleccionaron 3 veredas de las 17 que pertenecen a la zona rural del municipio de Salento, esto con base a estudios realizados anteriormente en el grupo de estudio, donde se ha reportado este organismo en la cuenca alta del Rio Quindío. Se realizaron mesas de diálogo con la Alcaldía de Salento, Empresas Públicas de Armenia y con la Corporación Autónoma Regional del Quindío, para definir la zona rural cercana a intervenir (Fig. 1). Se definieron los criterios de selección para las veredas pertenecientes a la zona rural del municipio de Salento y se eligieron en total 3 veredas.

Criterios de selección

- Acceso a las veredas (Corredores viales en buen estado para poder ingresar a cada vereda).
- Mayor número de viviendas habitadas y con presencia de población infantil (Censo previo por la alcaldía de Salento).
- Aproximación de las veredas a fuente hídrica (15-20m)



Figura 1: Zona rural del municipio de Salento, Vereda Palestina, Canaan y Chaguala. Realizada en Google Earth por el autor

Toma de muestras de heces en población infantil, animales y encuestas de factores de riesgos

Antes de la toma de cada muestra, se visitó a la población en diferentes encuentros, con el fin de socializar la propuesta de investigación y el impacto de la misma, además de tomar la autorización de los padres, para que los niños pudieran formar parte de este estudio, se diligenció el consentimiento informado y una encuesta sociodemográfica y epidemiológica que contenía los siguientes aspectos a evaluar, nivel de escolaridad, acceso a servicios públicos, hábitos en el hogar, presencia de mascotas, manipulación de alimentos.

Valoración antropométrica: Se llevó a cabo una valoración antropométrica de los niños participantes.

Criterios de exclusión: niños mayores de 14 años y niños que hubieran tenido un tratamiento antiparasitario en el transcurso de los últimos 3 meses.

Criterios de inclusión: Contar con el consentimiento informado por parte de los padres y/o acudientes, contar con la encuesta epidemiológica debidamente diligenciada.

Las muestras se recibieron en recipiente estéril, debi-

damente rotulados y se conservaron en cadena de frío hasta su procesamiento en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM).

Posteriormente las muestras (1 gr de materia fecal) se pasaron a tubos falcón con 5 ml de solución salina isotónica y se realizó un filtrado con gasa. Se realizó el método de concentración y de recuperación utilizando el método de Ritchie este método ha sido previamente estandarizado por el grupo (17).

Para la toma de muestras en animales, se realizó tomando heces que se encontraban en la misma vivienda realizando la toma directa con una espátula almacenándola en recipientes estériles para coprológicos, y fueron transportadas en cadena de frío al lugar de su procesamiento como es descrito antes. Cabe resaltar que las muestras se separaban en bolsas ziploc y en diferentes neveras evitando contaminación cruzada.

Análisis bacteriológico: Cuarenta y dos (42) muestras coprológicas fueron observadas por una bacterióloga bajo montaje directo. A la población se le reportó el resultado y se les brindó tratamiento gratuito a los niños parasitados por parte de los médicos de la Universidad del Quindío.

Toma y procesamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua fueron recolectadas en recipientes de plástico de 10 L previamente esterilizados en UV. Estos fueron sumergidos totalmente a contracorriente en la quebrada hasta que esté lleno y fueron debidamente rotulados con fecha y lugar del cual se obtuvo la muestra. (18). Seguidamente, en el lugar de la toma de la muestra del afluyente superficial fueron registrados los datos de las variables fisico-químicas (pH, temperatura, DBO, DQO, turbidez, conductividad). Las muestras se transportaron en frío en nevera portátil, hasta el laboratorio donde se realizó el método de concentración y recuperación de protozoos en solución de formalina/éter (19).

Para la red domiciliaria se realizó el mismo proceso tomando los 10 L en cada uno de los hogares donde se tomó muestra de heces de la población infantil, se realizó un proceso de desinfección del grifo, las muestras de red domiciliaria fueron tomadas del grifo de la cocina o lavaplatos y se transportaron en cadena de frío, para ser procesadas en el en el CIBM

Toma y Procesamiento de las Muestras de Alimentos y superficies inertes

Se recolectaron diferentes alimentos no procesados (Lechuga, zanahoria, tomate, repollo, acelga) que podía brindar la comunidad al momento de la visita, de acuerdo a disponibilidad de su despensa, se recolectaron y se depositaron por separado en una bolsa ziploc (Porciones de lechuga, acelga, apio y cilantro, tomates y zanahorias enteros) debidamente rotuladas, se transportaron en cadena de frío en diferentes neveras al CIBM. Posteriormente se le realizó un lavado del alimento en una bolsa con solución salina, después se le agregó el extractante (Glicina 1M pH 5.5- 75.07g en 1000ml, Solución de lavado pH 3.5 à PBS+ Tween 80+ Ácido sulfámico) esto dependiendo de la superficie de cada tipo de alimento, luego se le realizó agitación mecánica para el desprendimiento de las formas parasitarias, se centrifugó a 3500 rpm x 10min en tubos falcón de 50 ml a una temperatura de 4 grados centígrados con un Vol. Final de 7,5 ml (20).

La recolección de muestra de las superficies inertes se realizó con hisopo y solución salina isotónica estéril haciendo un frotis por el área del objeto (Tabla- cuchillo), en el cuchillo se realizaba el frotis por ambas caras y en la tabla por la parte de su uso. Se guardaron en tubos de ensayo que contenían solución salina al 0,9% debidamente rotulados y llevadas al CIBM, donde se agitó

el hisopo, la solución salina que quedó fue sometida al método de concentración y recuperación mencionado anteriormente.

Toma y procesamiento de las muestras de suelo

Estas fueron tomadas en el jardín de cada vivienda. Se realizó un cuadrante 5x5 m, se tomó un punto en cada esquina y uno en el centro, obteniendo un total de 200 g de suelo superficial, los cuales se tamizaron en una bolsa BagFilter, y se tomaron únicamente 25 g para analizar, se agregó el extractante (75 mL de Glicina 1M) y se realizó una agitación mecánica durante 30 minutos en agitador mecánico a 360 r.p.m. Posteriormente se dejó en reposo durante 5 minutos y el sobrenadante se pasó a tubos cónicos de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 1.500 gravedades durante 15 minutos hasta concentrar la muestra .

Extracción de ADN

A las 140 muestras recolectadas se les realizó extracción de ADN, utilizando el kit de extracción de Wizard Genomics de Promega con sus respectivos controles negativos de extracción (reactivos sin adición de muestra de ADN). El control positivo (todos los reactivos usados en la PCR más un ADN del que se conocía previamente su estabilidad). El ADN total obtenido al final del protocolo se cuantificó y se midió la pureza en una relación de 260-280nm en el Epoch™ BioTeK.

Detección molecular. La extracción de ADN de las muestras coprológicas, se realizó de acuerdo con un protocolo estandarizado previamente por el grupo, para ello se utilizó el kit de extracción Wizard Genomics (PROMEGA).

Brevemente: todas las muestras obtenidas fueron lavadas 3 veces con PBS a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C con el fin de reducir impurezas. Se partió con 300 µl de la muestra a analizar suspendida en PBS, a ésta se le agregó 600 µl de DNAzol, 10 µl alcohol isoamílico y perlas de zirconio de 1 mm. Se realizó agitación con el Mini Bead-beater por un minuto, luego la muestra se incubo por 1 minuto en hielo, este procedimiento se realizó cinco veces. El sobrenadante se trasladó a otro tubo limpio y se le agregó 200 µl de lisis nuclear, se realizó agitación en vortex por 20 segundos y se incubó a 37°C por 30 minutos. Después de incubar, se le agregó 100 µl de precipitación de proteínas, se realizó agitación en vortex por 20 segundos, se dejó reposar en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 13.500 rpm por 1 minuto. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se le agre-

go 300 µl isopropanol, se centrifugó a 13.500 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante con mucho cuidado y se le agregan 200 µl etanol al 75% se centrifugó a 13.500 rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante con mucho cuidado, se dejó secar el tubo y se le agregó 80 µl de DNA rehidratante. Adicionalmente en cada ensayo se procesó una muestra sin ADN (400 µL de PBS) como control de contaminación durante el proceso de extracción. Como control positivo se utilizó el ADN de una cepa de referencia aisladas de estudios previos y debidamente confirmada por secuenciamiento.

A la cantidad de ADN extraído se le realizó la cuantificación y la purificación, con una segunda lectura de la misma solución a 280 nm. Posteriormente se realizó la amplificación del ADN por PCR, para todas las muestras recolectadas de población infantil y de matrices ambientales para un total de 140 muestras.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando como marcador el gen (SSARNr). Los protocolos de amplificación para ese organismo han sido estandarizados por el grupo previamente. Para detectar el ADN de *Blastocystis* sp., se utilizó una PCR convencional que amplifica el gen de la subunidad menor de ARN ribosomal (SSARNr). Los primers de la PCR fueron Forward RD5: 5' ATCTGGTTGATCCTGCCAGT '3 y reverse BhDr: 5' GAGCTTTTAACTGCAACG '3' (611pb). El Mix para la PCR en todas las matrices consistió en 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 1,5 µl de cada cebador al 10 µM, 7,0 µl de agua, grado molecular, 0,5 µl de BSA y 2 µl de ADN para un volumen final de 25 µl. Los parámetros de amplificación fueron, una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos empezando con la desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, un anillamiento a 56.3 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 30 segundos y un paso adicional de extensión final por 10 minutos a 72 °C

La presencia de producto amplificado fue de 611pb. Se utilizaron como controles negativos para PCR y extracción de ADN (todos los reactivos menos la muestra), así como el control positivo para *Blastocystis* sp (cepa de referencia aislada y confirmada). Para observar los productos amplificados se llevó a cabo una electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1,5% con 6 µl de SYBR Green en buffer TBE 0,5X a un voltaje de 100 V por 45 minutos y se observó en un transiluminador (UVP White/Uv, TMW20). Es importante mencionar que las muestras ambientales suelen tener bajas canti-

dades de ADN diana y contienen altas cantidades de inhibidores de la PCR, en comparación con otros tipos de muestras, como los aislados de cultivos. No obstante, el efecto de los inhibidores de la PCR podría atenuarse significativamente añadiendo BSA que aumenta la estabilidad de la actividad de la enzima polimerasa y su vida media en las reacciones (21), en este caso se utilizó con un volumen de 0.5ul.

Secuenciación y análisis filogenético para determinar variabilidad genética. Después de obtener los productos de amplificación por PCR, las muestras positivas se enviaron a secuenciar, con el fin de identificar los subtipos que están circulando. Estas se enviaron a Pso-magen USA y se secuenciaron mediante secuenciación capilar en ambas direcciones. Al obtener las secuencias, éstas se agruparon bajo el software ClustalW, en el programa MEGA 11. Para establecer inferencias filogenéticas. Las secuencias nucleotídicas obtenidas para el gen SSARNr de las muestras de agua, alimentos y población infantil, fueron sometidas a un proceso de depuración y evaluación de control de calidad, se curaron y agruparon las secuencias que obtuvieron puntaje QV> 20 (Los valores superiores a 20 generalmente significan que una secuencia es confiable). Además, se realizó un nBLAST para ambas cadenas (Forward y Reverse) usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmar si las secuencias obtenidas correspondían al blanco de amplificación objeto de estudio. Con el fin de identificar los subtipos de *Blastocystis* encontrados en las muestras secuenciadas, se construyó un "data set" con las secuencias nucleotídicas depuradas y ensambladas, más las secuencias de referencia del gen 18S SSRNAr de 18 subtipos de *Blastocystis* sp. depositadas en el GenBank.

Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo de ClustalW y la filogenia fue establecida empleando el programa MEGA versión 11 (<http://www.megasoftware.net/>), por el método de distancias filogenéticas usando el método Maximum Likelihood, modelo de sustitución Kimura 2-parámetros, el cual tiene en cuenta aspectos como los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre otros aspectos. La fiabilidad de los árboles se evaluó con un bootstrap de 1000 réplicas.

Análisis estadísticos. Se realizó un análisis estadístico descriptivo para determinar la positividad y frecuencia

de las muestras en la población infantil y en las matrices ambientales.

Aspectos bioéticos

El proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío

Resultados

Frecuencia de ADN de *Blastocystis* sp. en heces de la población infantil y en diferentes matrices ambientales

Se recolectaron un total de 140 muestras en las tres veredas seleccionadas de la zona rural, entre las diferentes matrices ambientales y población infantil (Tabla 1) en un muestreo condicionado por disponibilidad de cada vivienda. Para la población infantil se lograron recolectar un total de 42 muestras coprológicas hallando una prevalencia de *Blastocystis* del 4,76% en los niños de edad escolar de la zona.

Tabla 1: Total de muestras recolectadas en cada una de las veredas de la zona rural del municipio de Salento.

Tipo de muestra	Canaan	Palestina	Chaguala
Afluente superficial	1	1	1
Red domiciliaria	6	6	6
Alimentos	4	5	8
Superficies	8	10	10
Suelo	5	6	4
Heces Animales	8	5	4
Coprológicos	10	15	17
Total por vereda	42	48	50
Total muestras		140	

Se recolectaron 17 muestras de alimentos de las cuales el 23,5% fueron positivas para *Blastocystis* sp. (Fig. 2) entre estas predominaron las verduras: tomate y zanahoria;



Figura 2: Amplificación por PCR de *Blastocystis* sp del gen SSARNr de aislados obtenidos de alimentos, en gel de agarosa al 1.5%. Pozo 1: Marcador de peso molecular (100pb). Pozo 2. Control Negativo Extracción (ADN). Pozo 3. Control Negativo (PCR). Pozo 4. Control Positivo. Pozo 5 -20. Muestras de aisladas de alimentos.

Del total de las muestras, 10 fueron positivas para *Blastocystis*, entre alimentos, red domiciliaria y población infantil (Tabla 2).

Tabla 2: Total de muestras recolectadas y porcentaje de positividad para *Blastocystis* sp.

Tipo de muestra	Total de muestras	Muestras positivas para <i>Blastocystis</i>	Porcentaje positividad
Alimentos	17	4	23,5 %
Heces animales	17	0	0
Afluente superficial	3	0	0
Red domiciliaria	18	4	22,2%
Superficies	28	0	0
Población infantil	42	2	4,76%
Suelo	15	0	0

En la red domiciliaria se analizaron un total de 18 muestras donde se obtuvo el 22,2% de frecuencia para *Blastocystis* sp. (Tabla 3). Del agua que recibe esta población el 77,5% pertenece al acueducto veredal de la zona rural el cual no posee ningún tipo de tratamiento de potabilización y aun así es consumida por sus habitantes, así que Un 88,2% (13/18) de las viviendas lavan estas frutas y verduras con agua cruda.

En las muestras del afluente superficial no se obtuvo la presencia de *Blastocystis* sp, estas muestras tenían en promedio un pH de 6,9, una turbidez de 193 NTU Y 78 us/cm en conductividad.

Tabla 3 Características del agua de red domiciliaria en la zona rural.

Características	Porcentajes
Abastecimiento de agua	77,7% (14/18) Acueducto Veredal
Consumo agua	38,8% (7/18) Sin hervir
Condiciones agua	61,1 % (11/18) Turbia

Sin embargo, es interesante notar que a pesar de encontrar la presencia del ADN de *Blastocystis* en la red domiciliaria no se observa población infantil infectada en estas mismas viviendas. Se encontró que la mayoría de los niños convivían con animales domésticos; pero en estas mascotas no se encontró la presencia de *Blastocystis* sp, así mismo en superficies como tabla y cuchillo y en muestras de suelo donde la presencia fue nula. La edad promedio de los niños en edad escolar evaluados fue entre 7 y 8 años, el peso promedio fue de 31,18 kilogramos y la talla promedio fue de 125 cm. Por Índice de masa corporal (IMC), se reportaron 8 niños en bajo peso (Tabla 4), entre ellos los dos niños reportados con presencia de *Blastocystis* sp (Fig. 3).

Tabla 4: Diagnostico para los niños en edad escolar de la población rural, según el IMC para la edad en niños y niñas.

Diagnostico	Casos	Presencia <i>Blastocystis</i>	Subtipo
Bajo peso	8	2	2 y 3
Normo peso	20	0	NA
Sobrepeso	6	0	NA
Obesidad	5	0	NA

NA: No Aplica

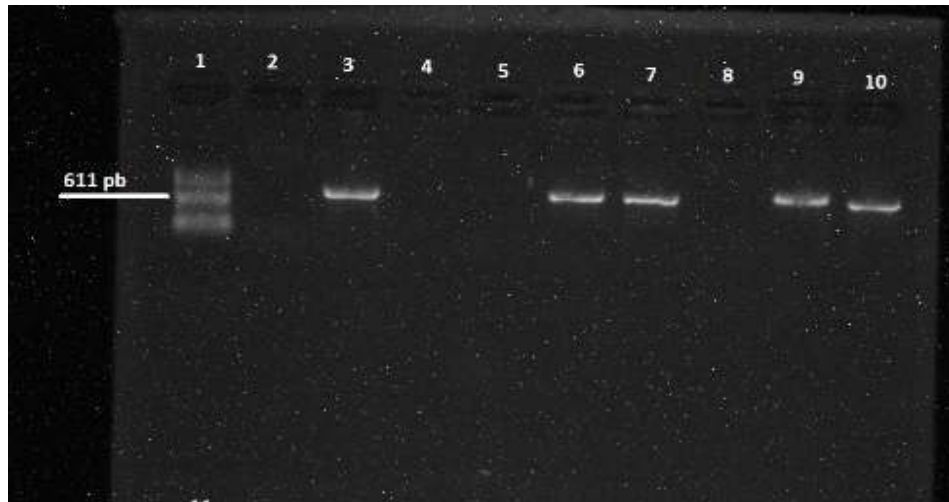


Figura 3: Amplificación por PCR de *Blastocystis* sp de aislados obtenidos de población infantil en gel de agarosa al 1,5%. Pozo 1: Marcador de peso molecular (100pb). Pozo 2. Control Negativo (ADN). Pozo 3. Control Positivo Pozo 4 -5: Vacíos. Pozo 6-7. Muestra de población infantil. Pozo 8. Vacío. Pozo 9-10: Duplicado muestra población infantil.

Como panorama general de los resultados obtenidos en este estudio (Fig. 4), se obtuvo mayor número de muestras positivas en la vereda Palestina (Población infantil, alimentos y red domiciliaria).

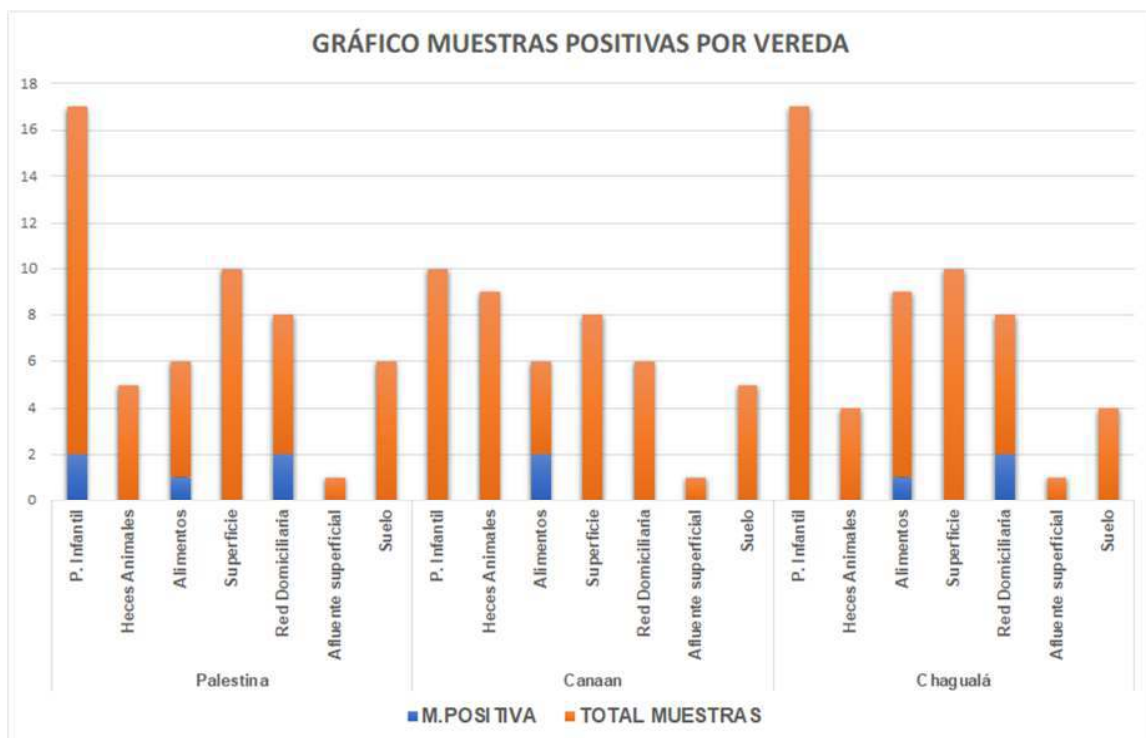


Figura 4: Total de muestras positivas por vereda y matriz ambiental.

Identificación de los subtipos de

sp. en heces de la población infantil y diferentes matrices ambientales. De las 42 muestras de población infantil y 98 de matrices ambientales, 10 muestras lograron ser amplificadas por PCR entre ellas de población infantil, agua y alimentos. Las 10 muestras positivas fueron enviadas a secuenciamiento (4 de alimentos, 4 de red domiciliaria y 2 de población infantil). Estas secuencias fueron utilizadas para análisis de agrupamiento por homología, luego de curación. Se realizaron alineamientos con secuencias de cepas de referencia de la misma región amplificada y luego se realizó un análisis de agrupamiento. El árbol obtenido (Fig. 5) permitió agrupar las secuencias con

el subtipo 2 en un 10 % (1/10) y el subtipo 3 en un 50% (5/10) de *Blastocystis* sp. Se obtuvo una agrupación de una muestra de población infantil con el subtipo 2 evidenciando así una transmisión antroponótica.

Se resalta que, el 50% de las muestras ambientales positivas para *Blastocystis* se agruparon con la secuencia de referencia del subtipo 3 entre ellas (alimentos como la zanahoria y la red domiciliaria) y que en las muestras de población infantil se encontró una muestra agrupada para el subtipo 2 y la otra para el subtipo 3. Ninguno de los otros subtipos de *Blastocystis* sp tuvo representatividad con las muestras de este estudio pues no se agruparon con las muestras lo que indica que no están interactuando con el humano.

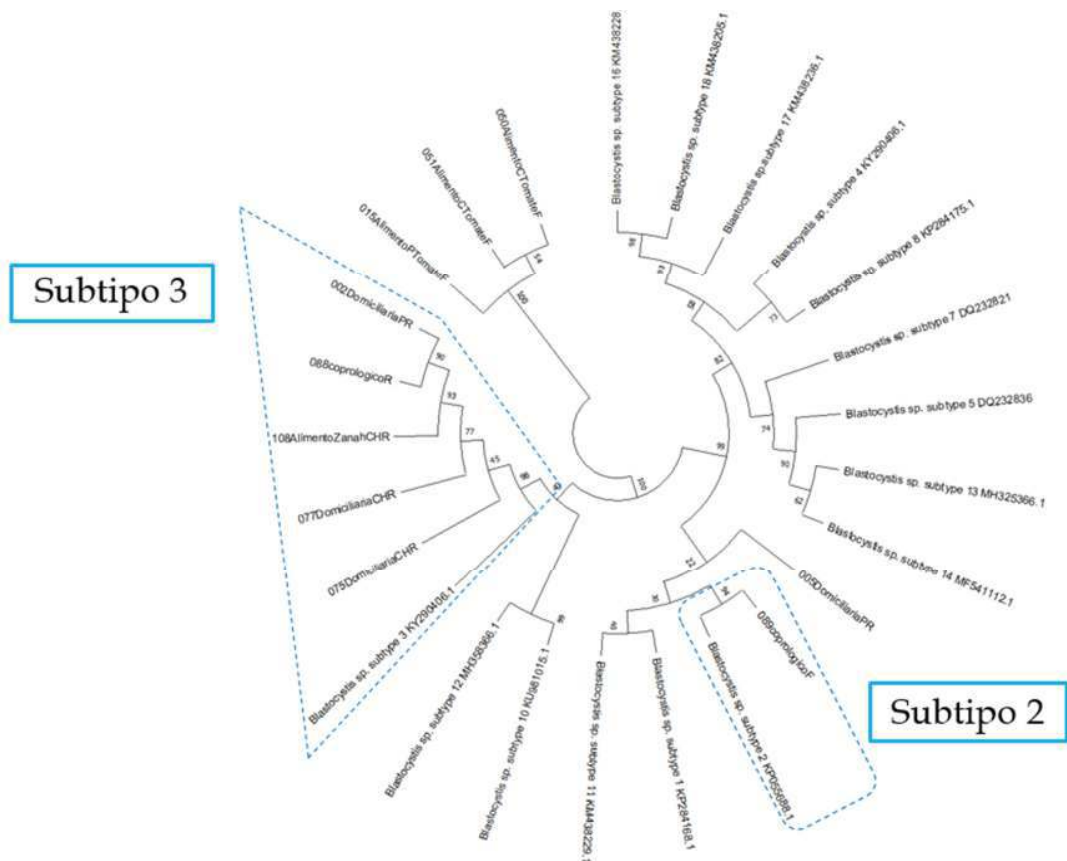


Figura 5: Relaciones filogenéticas usando el método máxima verosimilitud con el software Mega 11, el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros la fiabilidad del árbol se obtuvo con 1000 réplicas, las secuencias de cepas de referencia de cada uno de los subtipos de *Blastocystis* sp obtenidas del Genbank (NCBI).

Además, se realizó microscopía óptica de las muestras de alimentos con Lugol (Fig. 6) evidenciando la presencia de protozoos ambientales, huevos similares a *Ascaris*, *Giardia* sp, entre otros de importancia en salud pública, presentándose en mayor prevalencia en tomate, identificando una infección simultánea con varios helmintos gastrointestinales, protozoos y con la presencia de *Blastocystis* sp.

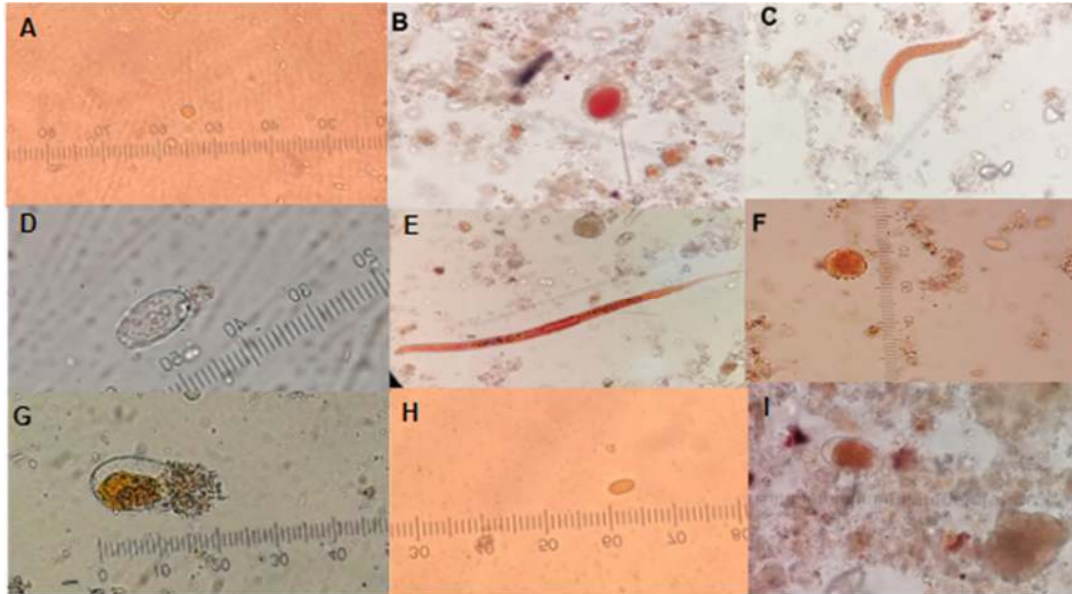


Figura 6: Microscopía óptica, Lugol 40x. A) Amoeba- tomate, B) Huevo similar *Ascaris*-Tomate C) Nematodo-Apio, D) Protozoo ambiental –tomate, E) Nematodo-Cilantro, F) Quiste similar a *Balantidium*- tomate, G) Protozoo de agua Uncinaria- repollo, H) *Giardia*-acelga, I) Huevo *Ancylostoma*-tomate

Se realizó microscopía óptica de todas las muestras coprológicas recolectadas (Fig. 7) encontrando diferentes organismos como huevo fértil de *Ascaris*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba Hystolitica*, *Dyspar* y *Blastocystis*, sp. Es importante mencionar que los 2 niños reportados como positivos para *Blastocystis* por microscopía y PCR tenían al mismo tiempo presencia de *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* y *dyspar*, pero eran asintomáticos.

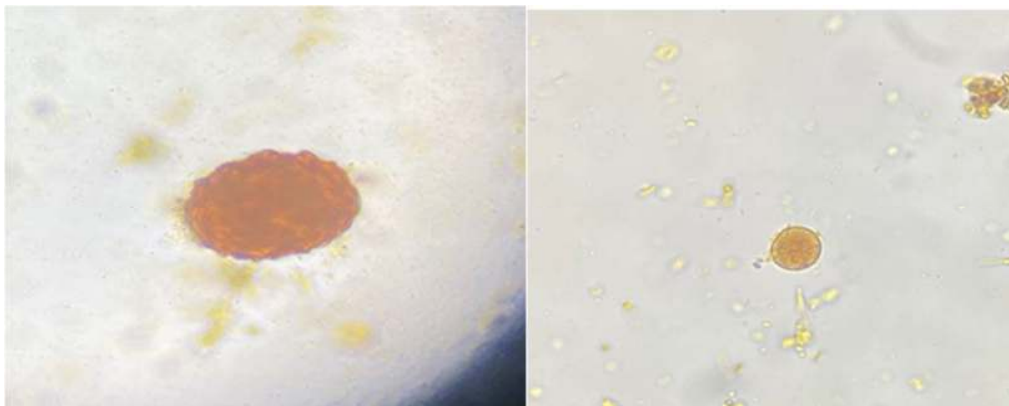


Figura 7: Microscopía óptica, tinción con Lugol (objetivo 40x). A) Huevo fértil de *Ascaris*, B) quiste de *Entamoeba coli*

Discusión

La vigilancia de los parásitos transmitidos por los alimentos y el agua es difícil, dado que no existen métodos estandarizados para el análisis de rutina y no existe ninguna regulación en este momento con respecto a estos riesgos biológicos. *Blastocystis* sp se ha encontrado en una amplia gama de hospedadores, pero también en el medio ambiente incluyendo el agua y el suelo (22) en nuestro estudio se evaluaron diferentes matrices ambientales que tienen inferencia en la adquisición del parásito, un estudio similar fue realizado en Tailandia en una zona rural evaluando en población infantil, animales, agua y suelo, donde se lograron identificar 8 subtipos en humanos, tres en animales, siete en agua y suelo (23).

En cuanto a los alimentos en este estudio se reporta una prevalencia de *Blastocystis* sp del 23,5 % distribuido en tomate y zanahoria. Esto sugiere a los alimentos como un vehículo potencial para este protozoo, como descri-

bimos anteriormente (24). Se asume que la presencia del parásito en estas verduras ocurre a través del agua contaminada ya sea por material fecal de origen humano o animal, posiblemente utilizado en la irrigación de huertos o por contaminación del suelo por uso de abono orgánico con heces. Las muestras recolectadas en este estudio se encontraban en cada uno de los domicilios, algunas obtenidas del mercado, otras cultivadas por sus propios dueños en pequeñas huertas.

Blastocystis se ha detectado mayormente en hojas de lechuga y, en menor medida, en otras hortalizas para ensalada. La mayoría de los estudios que exploran la presencia de este organismo en hortalizas proceden de países de Oriente Medio y Sudamérica. En nuestro estudio obtuvimos muestras positivas en su mayoría en tomate y zanahoria asociadas con el subtipo 3 de *Blastocystis* al igual que lo reportado en el estudio realizado en el 2023 donde obtuvieron positividad en diferentes verduras entre estos tomate y zanahoria, donde el subtipo (ST) 3 fue el más frecuente (25) y está ampliamente distribuido en todo el mundo, habiéndose encontrado en seres humanos, animales y también en el medio ambiente.

El consumo de vegetales crudos a menudo contribuye a un papel epidemiológico en la transmisión de enfermedades parasitarias transmitidas por los alimentos. Los vegetales se contaminan con diferentes fases parasitarias (quistes, oquistes, óvulos, larvas) durante el riego con aguas residuales o por contaminación directa de animales y humanos durante la cosecha, empaque, transporte, procesamiento, distribución y mercadeo. Los microorganismos suelen adherirse a las hortalizas de hoja verde con superficies irregulares, mientras que su presencia en verduras con superficies lisas es menor. (26). La estratificación múltiple y la rugosidad de las hortalizas podrían crear micro nichos que favorecen la adhesión de *Blastocystis* (27).

El uso de herramientas con mayor poder de detección, resolución taxonómica y genotipificación, además, de la implementación y continuo avance de estrategias mediante las cuales se obtiene información genómica de *Blastocystis*, han permitido detectar e interpretar eventos evolutivos particulares y establecer la presencia de infecciones por varios subtipos en un mismo hospedador.

Se identificó que dos niños fueron positivos para *Blastocystis* subtipo 2 y 3. *Blastocystis* subtipo 3 ha sido

reportado como el protista entérico más frecuente en la ciudad de Medellín (28). En las matrices ambientales (alimentos y agua, se identificó *Blastocystis* subtipo 3 representando la transmisión en fuentes ambientales en comparación con un estudio en Colombia donde el subtipo 1 y 2 tuvieron una mayor prevalencia, según Ramírez en el (2017), para el departamento del Quindío se encontró con mayor frecuencia los subtipos 1, 3, 6 y 7. En comparación con los datos obtenidos en nuestro estudio donde se evidenció el subtipo 2 y 3 (29).

En nuestro estudio se reporta en red domiciliaria en un 22,2 % de prevalencia del parásito, lo cual puede ser un factor determinante en la contaminación de las otras fuentes analizadas probablemente al ser usada para lavar las verduras ya que el 88,2 % viviendas estudiadas lavan estos alimentos con agua cruda, así mismo el suelo que ya ha sido reportado como vía de transmisión anteriormente y la presencia o contacto estrecho de animales (30) matrices de las cuales no obtuvimos presencia de *Blastocystis*, probablemente esto puede deberse a que los muestreos fueron realizados en su mayoría en altas lluvias y por fenómenos como la escorrentía y la infiltración del agua en el suelo va ser menor la probabilidad de encontrar este protozoo, así como por características ambientales que varían del suelo como pH, humedad y temperatura.

Este estudio piloto pionero proporciona la primera investigación molecular de *Blastocystis* y sus subtipos en población infantil y en diversas matrices ambientales en una misma zona geográfica. Nuestros resultados apuntan a que las verduras y el agua son una vía de transmisión de *Blastocystis* sp. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la reducción o prevención de la contaminación por parásitos en verduras en las distintas etapas de la cadena de suministro alimentario, garantizando la seguridad alimentaria y así mismo la infección en población humana ya que en principio los alimentos deben estar libres de parásitos y el ADN es un indicador indirecto de su presencia y cualquier contaminación indica un fallo en las buenas prácticas agrícolas o de los alimentos.

Este estudio es el que ha analizado la mayor diversidad de fuentes para *Blastocystis* sp y su asociación con población infantil simultáneamente en una misma zona de estudio y en él se confirma lo hallado en estudios previos enfocados específicamente en algunas de ellas (8) indicando que los alimentos y el agua siguen siendo una vía de contaminación del protozoo parásito.

La secuenciación fue relevante para confirmar cuales subtipos de *Blastocystis* que infectan humanos estaban presentes en los alimentos y en las muestras de agua. Los subtipos 1, 2 y 3 de *Blastocystis* han sido reportados anteriormente en población infantil y asociados con diarrea y síndrome de intestino irritable. En un estudio realizado en Tailandia lograron detectar *Blastocystis* sp. Subtipo 1 en muestras de agua en una escuela rural (31). En Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina el subtipo 3 presenta una mayor prevalencia, en comparación con Colombia donde el subtipo 1 y 2 tienen una mayor prevalencia (9) para el departamento del Quindío especialmente la ciudad de Armenia se encontró con mayor frecuencia los subtipos del 1, 2 y 3 y 6 y 7 (13).

Los resultados reportados en este estudio, reflejan la posibilidad de existencia de diferentes rutas de transmisión para la contaminación con *Blastocystis* sp en la población infantil analizada. La diversidad de subtipos de *Blastocystis* reportada en humanos, animales y fuentes hídricas, son fuerte evidencia de condiciones eco-epidemiológicas, asociadas con el mecanismo de infección oro-fecal y la facilidad de dispersión del parásito en la naturaleza, que favorecen su transmisión asociada con malos hábitos higiénicos y sanitarios, inadecuada eliminación de excretas, y contaminación de aguas de consumo humano y alimentos (15). Según un estudio realizado en niños en asentamientos rurales de Puerto Nariño los perfiles del poli parasitismo, presentados como díadas y tríadas, estuvieron conformados principalmente por las combinaciones de *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *Blastocystis* sp., ancilostomídeos y el complejo Entamoeba. En este estudio reportamos la presencia del complejo Entamoeba al mismo tiempo que la presencia de *Blastocystis* sp en niños de edad escolar.

Posiblemente podemos evidenciar la infección interhumana por *Blastocystis* sp, en los 2 menores positivos para el protozoo, sin ninguna otra matriz en su vivienda reportada positivo como lo reportado en un estudio realizado en Bolivia donde se reporta la posibilidad de transmisión interhumana por manos sucias, relación orogenital y oroanal (26). Por otro lado, posiblemente estos menores de edad escolar adquirieron la infección por medio de otra matriz no evaluada en este estudio,

dado a que el 72,2% (13/18) de los niños también reciben diferentes alimentos y agua en el lugar donde estudian y permanecen media jornada por lo cual el monitoreo de estos protozoos en el agua de consumo y en los alimentos frescos es necesario para prevenir riesgos a la salud pública en poblaciones humanas. En particular, la higiene, el consumo y uso de agua hervida sigue siendo significativo a la hora de disminuir el riesgo de infección, así mismo es importante señalar que las medidas de prevención en el hogar con los padres son importantes para reducir la infección de los niños en casa.

Conclusiones

Este trabajo es el primer estudio que identifica la presencia de *Blastocystis* en niños de edad escolar y su asociación con las diferentes fuentes de transmisión en una zona desatendida como la zona rural del departamento del Quindío.

Se identificó la presencia de ADN de *Blastocystis* sp del 23,5 % en alimentos (tomate y zanahoria), 22,2 % en agua y del 4,75% en población infantil. Es el primer estudio en Colombia donde se reporta el subtipo 2 y 3 de *Blastocystis* en heces de la población infantil, además del subtipo 3 en matrices ambientales en zona rural. No se encontró asociación entre la presencia de *Blastocystis* sp en población infantil y las variables sociodemográficas. Se encontró una asociación entre el subtipo 3 presente en población infantil y en matrices ambientales (agua y alimentos no procesados).

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, Empresas Públicas de Armenia, a la Alcaldía de Salento, al Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL) de la Universidad del Quindío y a la población en general.

Conflicto de intereses y financiación.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MINCIENCIAS), mediante la convocatoria 874 de 2020.

Referencias

1. Werner Apt B. Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2014; 25(3):485-528. doi: 10.1016/S0716-8640(14)70065-3
2. del Coco VF, Molina NB, Basualdo JA, Córdoba MA. *Blastocystis* spp.: avances, controversias y desafíos futuros. *Rev Argent Microbiol*. 2017; 49(1):110–8. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.004>
3. Barrios E. E, Contribución de la Infección por *Blastocystis* spp. en la patogenia del Síndrome de Intestino Irritable.. *Salus* 2017;21(2):5-6. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375953625002>
4. Ministerio de Salud y Protección Social, Universidad de Antioquia. Encuesta Nacional de parasitismo Intestinal en población Escolar Colombia 2012-2014; Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/encuesta-nacional-de-parasitismo-2012-2014.pdf>
5. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One*. 2014 Nov 3;9(11) doi: 10.1371/journal.pone.0111868.
6. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis* hominis. *Parasitol Res* 2008; 103(3):685-9. doi:10.1007/s00436-008-1031-3
7. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis* hominis revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9(4):563-84. doi: 10.1128/CMR.9.4.563
8. Basualdo JA, Córdoba MA, De Luca MM, Ciarmela ML, Pezzani BC, Grenovero MS, et al. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49(4):251-5. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000400011>
9. Ramírez JD, Flórez C, Olivera M, Bernal MC, Giraldo JC. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One* 2017; 12(2): e0172586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172586>
10. Osorio-Pulgarin, M.I.; Higuera, A.; Beltran-Álzate, J.C.; Sánchez-Jiménez, M.; Ramírez, J.D. Epidemiological and Molecular Characterization of *Blastocystis* Infection in Children Attending Daycare Centers in Medellín, Colombia. *Biology* 2021, 10, 669. <https://doi.org/10.3390/biology10070669>
11. Hernández PC, Morales L, Chaparro-Olaya J, Sarmiento D, Jaramillo JF, Ordoñez GA, et al. Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. *PLoS One*. 2019;14(7). doi: 10.1371/journal.pone.0218681
12. Potes-Morales C, Osorio-Delgado LA, Carranza JC, Vallejo GA. The first molecular detection of *Blastocystis* subtypes in human faecal samples from Ibagué, Colombia. *Parasite Epidemiol Control*. 2020 Jan 3;9:e00132. doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00132.
13. Muñoz-Sánchez, D., Triviño-Valencia, J., Lora-Suarez, F. et al. *Blastocystis* Subtypes and Culture Characteristics of Isolates from Human Stools Related with the Presence of Gastrointestinal Symptoms: A Case–Control Study. *Acta Parasit*. 66, 1466–1471 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00419-y>
14. Domínguez Márquez M. V. Heterogeneidad genética de *Blastocystis* hominis: Implicaciones patogénicas. Tesis doctoral. Universidad de València. Ser of Pub.2003 Disponible en : <https://core.ac.uk/download/pdf/70998484>.
15. Matovelle Ochoa C., Rubio Aranda E., Goñi Cepero Ma Pilar. Epidemiology of *Blastocystis* spp. in Aragón. (trabajo de fin de master), 2017, p. 1-42 Disponible en : <https://zagan.unizar.es/record/111092/files/TAZ-TFM-2018-664.pdf?version=1>
16. Fonte Galindo L, Fong González A, Méndez Sutil Y, Moreira Perdomo Y. Patogenicidad de *Blastocystis* sp. Evidencias y mecanismos. *Rev Cubana Med Trop [Internet]*. 2014 Dic; 66(3): 312-321. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602014000300001&lng=es
17. Lora-Suarez F, Rivera R, Triviño-Valencia J, Gomez-Marin JE. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res [Internet]*. 2016;100:377–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.038>

18. Pinto-Duarte VA, Hernández-Arango NM, Marin-Gallego BJ, Toloza-Beltrán PA, Lora-Suarez FM, Gómez-Marín JE. Detection of *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* in soil and water samples in the Quindío River basin, Colombia. *Food Waterborne Parasitol.* 2022 Aug 9;28:e00175. doi: 10.1016/j.fawpar.2022.e00175.
19. Lora Suarez FM. Estandarización de una técnica basada en concentración éter formalina y su aplicación para detección y genotipificación de parásitos protozoos transmitidos por agua para consumo humano en Colombia. 2016 Oct 11; Available from: <https://bdigital.uniquindio.edu.co/handle/001/6089>
20. Hernández-Arango N, Pinto V, Muñoz-Sanchez D, Lora-Suarez F, Gómez-Marín JE. Detection of *Giardia* spp. with formalin/ether concentration in *Brassica oleracea* (cabbage) and *Lactuca sativa* (lettuce). *Heliyon.* 2019 Aug 28;5(8):e02377. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02377.
21. Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina* Vol 3.2014 3(1), 25-33. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>.
22. Elseadawy R, Abbas I, Al-Araby M, Abu-Elwafa S. Occurrence and molecular characterization of *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri* and *Blastocystis* in water samples from various sources in Egypt. *Acta Trop.* 2023 Jan;237:106733. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106733.
23. Jinatham V, Maxamhud S, Popluechai S, Tsaousis AD, Gentekaki E. *Blastocystis* One Health Approach in a Rural Community of Northern Thailand: Prevalence, Subtypes and Novel Transmission Routes. *Front Microbiol.* 2021 Dec 9;12:3800. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746340>
24. Londoño-Franco ÁL, Loaiza-Herrera J, Lora-Suárez FM, Gómez-Marín JE. Frecuencia y fuentes de *Blastocystis* sp. en niños de 0 a 5 años de edad atendidos en hogares infantiles públicos de la zona urbana de Calarcá, Colombia. *Biomédica* 201434(2):218–27. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2124>
25. Jinatham V, Wandee T, Nonebudsri C, Popluechai S, Tsaousis AD, Gentekaki E. *Blastocystis* subtypes in raw vegetables from street markets in northern Thailand. *Parasitol Res.* 2023 Apr;122(4):1027-1031. doi: 10.1007/s00436-023-07781
26. Li, J., Wang, Z., Karim, M.R. et al. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasites Vectors* 13, 380 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04255-3>
27. Abougrain, Amal & Nahaisi, Mohamed & Madi, Nuri & Saied, Mohamed & Ghenghesh, Khalifa. (2010). Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food Control.* 21. 760-762. doi :10.1016/j.foodcont.2009.11.005.
28. Toro M, Hernandez C, Agudelo S, Botero J, Orozo C, Quintero K, Correa J, Munera A. *Blastocystis* subtipo 3 es el protista entérico más frecuente en pacientes con manifestaciones gastrointestinales en la ciudad de Medellín. 2022. Disponible en :<https://hdl.handle.net/10495/33371>
29. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 2016;41:32-5. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>.
30. Al Nahhas S, Aboualchamat G. Investigation of parasitic contamination of salad vegetables sold by street vendors in city markets in Damascus, Syria. *Food Waterborne Parasitol.* 2020 1;21. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00090>
31. Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Feb;88(2):352-8. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0237.