



Diversidad genética de *Blastocystis* spp: actualización sobre su virulencia y patogenicidad

Genetic diversity of *Blastocystis* spp: update on virulence and pathogenicity

Carlos Fernando Yauli Flores. ^{1,2}, Omar Fernando Olmos Almachi. ^{1*}

¹ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico, Ambato – Ecuador;

² Genomic Medical, Laboratorio Clínico y Centro de Especialidades Médicas, Ambato – Ecuador; cf.yauli@uta.edu.ec.

* Correspondencia: oolmos5098@uta.edu.ec



RESUMEN

Blastocystis spp. es un parásito intestinal con amplia diversidad genética, destacando 4 subtipos relacionados con sintomatología gastrointestinal y extraintestinal: ST1, ST2, ST3 y ST4. Múltiples estudios describen los mecanismos de virulencia, patogenicidad, y de resistencia que debaten su controversial comensalismo: evasión inmunitaria por degradación de sIgA, daño celular mediado por cisteín proteasas, y resistencia ante agentes químicos/farmacológicos. El presente artículo recopila información actualizada sobre los mencionados mecanismos, genotipos, y métodos de diagnóstico. Comprender el comportamiento biológico de este protozoo es necesario para mejorar el abordaje diagnóstico y terapéutico. La caracterización molecular y la implementación de ensayos celulares que evalúen la actividad de los subtipos de *Blastocystis* spp. en el tracto intestinal humano, pueden contribuir al entendimiento de su actividad patogénica.

Palabras clave: *Blastocystis* spp; diagnóstico; patogenicidad; subtipos; virulencia.

ABSTRACT

Blastocystis spp. is an intestinal parasite with broad genetic diversity, highlighting four subtypes related to gastrointestinal and extraintestinal symptomatology: ST1, ST2, ST3, and ST4. Multiple studies describe the mechanisms of virulence, pathogenicity, and resistance that debate its controversial commensalism: immune evasion by sIgA degradation, cell damage mediated by cysteine proteases, and resistance to chemical/pharmacological agents. The article compiles updated information on the abovementioned mechanisms, genotypes, and diagnostic methods. Understanding the biological behavior of this protozoan is necessary to improve the diagnostic and therapeutic approach: molecular characterization and implementation of cellular assays that evaluate the activity of *Blastocystis* spp. Subtypes in the human intestinal tract may contribute to understanding their pathogenic activity.

Keywords: *Blastocystis* spp; diagnostic; pathogenicity; subtypes; virulence.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias intestinales representan un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en regiones socioeconómicas vulnerables¹. En este contexto, *Blastocystis* spp., un protozooario pleomórfico de distribución cosmopolita y amplia diversidad genética, ha ganado interés debido a la creciente evidencia de sus implicaciones patológicas gastrointestinales y extraintestinales². El estudio de este microorganismo y su adaptabilidad biológica permite abordar diferentes perspectivas diagnósticas y terapéuticas¹.

Históricamente, *Blastocystis* spp. se consideraba como un “hongo imperfecto”. No obstante, con el avance de estudios moleculares, permitieron clasificarlo dentro del dominio *Eukarya*, reino *Protista*, superfilo *Stramenopiles*, familia *Blastocystidae* y género *Blastocystis*^{1,3}. La prevalencia de este protozooario es mayor en países en vías de desarrollo debido al acceso limitado al agua potable y medidas deficientes de saneamiento^{1,4}.

La correlación entre subtipos específicos (principalmente ST1 a ST4) con manifestaciones gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, flatulencias) y cutáneas (urticaria), destacan la necesidad de futuras investigaciones que expliquen esta relación causal^{1,2}. La heterogeneidad clínica de las infecciones se relaciona con los mecanismos de virulencia y patogenicidad del parásito (sIgA proteasas, cisteín proteasas)^{5,6}, la respuesta inmune del huésped y la composición del microbioma⁷⁻¹⁰.

Blastocystis spp. representa un desafío significativo para la salud pública debido a su resistencia ante agentes químicos (Cl y H₂O₂) a determinadas concentraciones, lo que aumenta el riesgo de contagio entre la población a pesar de las estrategias de saneamiento y desinfección del agua para consumo humano¹¹. También, se ha demostrado resistencia ante fármacos empleados como tratamiento para esta infección, entre ellos, al metronidazol¹².

Comprender los mecanismos de adaptación biológica de *Blastocystis* spp. y su diversidad genética es fundamental para mejorar los métodos de detección, el reporte de laboratorio, y enfocar la atención en su correcto abordaje clínico¹. En este contexto, el presente artículo busca conocer la epidemiología, mecanismos de virulencia y patogenicidad, y proporcionar la información necesaria para conocer el impacto y evolución de los subtipos de *Blastocystis* spp.

DESARROLLO

Generalidades sobre *Blastocystis* spp.

Blastocystis spp. es un parásito pleomórfico intestinal que infecta a más de 1.000 millones de personas en el mundo¹. Tiene distribución cosmopolita y tradicionalmente es considerado como un comensal. Aunque su detección mediante exámenes de laboratorio clínico (coproparasitario)^{13,14} no era considerado como un problema de salud, actualmente la controversia sobre su patogenicidad demuestra lo contrario¹. Este parásito presenta seis formas:

- **Vacuolar:** Mide de 5 a 15 μm , y posee de 1 a 4 núcleos con organelas celulares periféricas. Contiene una vacuola central de lípidos e hidratos de carbono con funciones metabólicas y de multiplicación celular. Esta es la forma más común detectada mediante microscopía en laboratorio^{1,15}.
- **Granular:** Mide de 6 a 8 μm , posee de 1 a 4 núcleos y gran cantidad de gránulos citoplasmáticos e intravacuolares. Las granulaciones tienen funciones metabólicas, lipídicas y de multiplicación celular¹.
- **Ameboide:** Su morfología es irregular, mide entre 3 a 8 μm y posee 1 o 2 pseudópodos. El citoplasma contiene vacuolas y 1 o 2 núcleos. La presencia de partículas ingeridas sugiere nutrición parasitaria¹.

- **Quística:** Son esféricos u ovoides, cuyo contenido celular consiste en múltiples vacuolas, depósitos de glucógeno y lípidos. Miden entre 3 a 10 μm y el número de núcleos puede variar de 1 a 4¹.
- **Multivacuolar y avacuolar:** Miden alrededor de 8 μm , no poseen cápsula y poseen de 1 a 2 núcleos. Se pueden encontrar en heces frescas, y su morfología podría relacionarse con diferentes estados de enquistamiento o desenquistamiento¹.

Su vía de transmisión es fecal-oral, asociado a la contaminación de alimentos y agua no tratada para consumo humano^{1,4}, lo que explica la variabilidad en su prevalencia: 0.5% – 35% en países desarrollados, y del 55% - 100% en países en vías de desarrollo². En los últimos años, se identificaron mecanismos de patogenicidad y variaciones fenotípicas en *Blastocystis* spp., debatiendo su rol en la salud humana^{16,17}. Su alta prevalencia tanto en humanos como en animales ha llevado a postular la posibilidad de una transmisión zoonótica^{1,18}.

La identificación de 26 genotipos (ST) de *Blastocystis* spp.¹⁹, de los cuales ST1 a ST9, y ST12 infectan a los humanos. Los subtipos ST1, ST2, ST3 y ST4 son los más prevalentes y frecuentemente asociados a manifestaciones clínicas². La distribución no es homogénea geográficamente, y se han reportado casos esporádicos de subtipos infrecuentes en el tracto intestinal humano, especialmente en países del continente africano y asiático^{20,21}.

La asociación entre la infección por *Blastocystis* spp. y síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, diarrea, vómitos, flatulencias, fatiga)²² sin otras causas aparentes (infecciones parasitarias, víricas o bacterianas) es un tema de amplio debate en la comunidad científica^{1,16}. Si bien, la mayoría de los estudios señalan al subtipo ST3 como el más predominante y asociado a casos sintomáticos^{13,17,23}, ST2 y ST4 también han mostrado dicha relación^{2,20}.

El potencial patogénico de *Blastocystis* spp. es controversial, pues la falta de información y consenso respecto a este tema representa un problema en la práctica clínica¹. La diversidad filogenética de este protozoo podría relacionarse con el desarrollo de enfermedad, expresión de mecanismos de virulencia y diferentes interacciones con la microbiota^{1,19}. Esta ambivalencia subraya la necesidad de estudios moleculares que expliquen las mencionadas interacciones huésped - parásito.

Factores de riesgo y asociaciones clínicas.

La infección por *Blastocystis* spp. está influenciada por factores socioeconómicos y condiciones higiénicas deficientes¹. Los niños y personas que han viajado a zonas de alta endemicidad, como América Latina y África, constituyen un grupo de riesgo importante para esta infección¹³. La transmisión de este protista puede ocurrir de manera directa entre personas²⁰, a través del agua o alimentos contaminados, y de forma zoonótica debido a su alta prevalencia en animales domésticos y de granja²³⁻²⁵.

Blastocystis spp. se ha relacionado con trastornos funcionales y enfermedades intestinales como el síndrome del intestino irritable (SII), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y colitis ulcerosa^{1,26}. Un estudio identificó una asociación significativa entre el subtipo ST3 y pacientes con SII. La prevalencia de este genotipo fue del 94%, y asociado al SII – diarreico²⁷. Estos hallazgos, apoyados por un OR: 2,833, refuerzan la hipótesis del papel patogénico de este parásito. Se plantea que los mecanismos moduladores que exacerban los síntomas de estas afecciones se deben a su diversidad filogenética y la actividad de sus proteasas²⁶.

En personas inmunodeprimidas, incluyendo pacientes con VIH/SIDA o que han recibido trasplantes de órganos, son más vulnerables a infecciones por *Blastocystis* spp.^{1,28}. Sin embargo, esta infección no tiene un impacto directo sobre parámetros clave como el recuento de células CD4 o la carga viral. Es relevante la relación entre la conducta homosexual y el riesgo de transmisión de este protista, posiblemente por prácticas sexuales específicas que facilitan el contacto con material fecal contaminado. Esto enfatiza la necesidad de mayor concientización y estrategias educativas en grupos de riesgo²⁸.

Manifestaciones clínicas asociadas a *Blastocystis* spp.

Numerosos ensayos clínicos demuestran que este agente etiológico puede causar alteraciones intestinales, dentro de los cuáles se incluyen: diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, náusea, vómitos, flatulencias y fatiga^{1,29-31}. Los subtipos ST1 a ST4 se relacionan frecuentemente con casos sintomáticos, siendo ST3 el de mayor prevalencia y con variaciones en sus epítomos³². Aunque en menor proporción, ST2 y ST4 también se relacionan con el desarrollo de manifestaciones clínicas^{2,20}.

Blastocystis spp. también se relaciona con manifestaciones extraintestinales como urticaria y anemia ferropénica. Esta última podría ser consecuencia de cuadros diarreicos prolongados que afecta la correcta absorción de nutrientes^{1,4}. Los síntomas cutáneos más frecuentes son: urticaria, picazón y prurito palmo-plantar³³. Un gran porcentaje de pacientes con manifestaciones cutáneas también presentan síntomas gastrointestinales, especialmente aquellos infectados con los subtipos ST1, ST2 y ST3³³.

El desarrollo de síntomas gastrointestinales y extraintestinales por infecciones con *Blastocystis* puede ser una causa desatendida debido a que las manifestaciones clínicas no son exclusivas de esta infección parasitaria. En consecuencia, la correcta anamnesis, reporte de laboratorio, descarte de otras etiologías y correlación con la clínica del paciente mediante un enfoque integral son fundamentales para su diagnóstico^{1,33}.

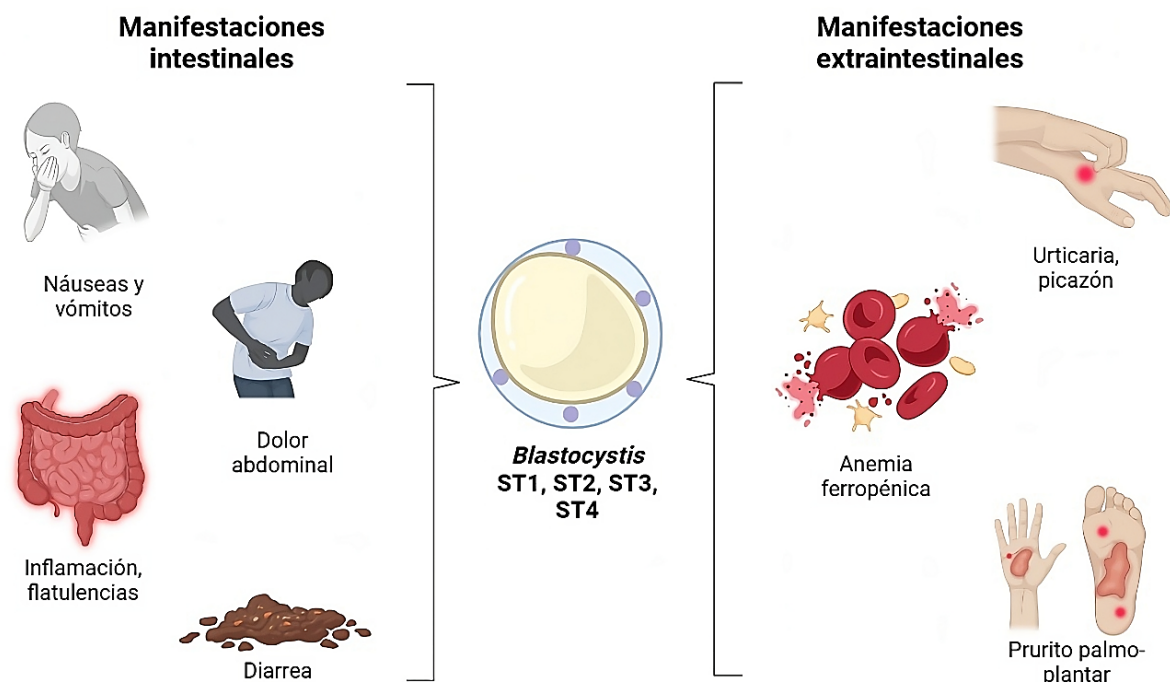


Figura 1. Manifestaciones clínicas causadas por los principales subtipos de *Blastocystis* spp.

Relación *Blastocystis* spp – microbiota: un balance entre beneficioso y perjudicial.

La microbiota intestinal es un complejo ecosistema con múltiples funciones relacionadas con el metabolismo, tolerancia inmunológica y homeostasis. Este entorno está conformado por bacterias, hongos, virus, organismos eucariotas y unicelulares^{7,8}. La colonización por *Blastocystis* spp. presenta interacciones tanto beneficiosas como perjudiciales con el microbioma, enriqueciendo determinados grupos de bacterias o reduciendo su población, provocando alteraciones intestinales^{7,8,34}. Esta relación fue observada en modelos experimentales con ratones, descubriendo alteraciones de la función cognitiva al alterar el microbioma intestinal³⁵.

En el ámbito beneficioso, *Blastocystis* spp. enriquece grupos bacterianos saludables como *Prevotella*, *Ruminococcus* y *Akkermansia muciniphila*, particularmente con los subtipos ST1, ST3 y ST4. Especies como *Succinivibrio dextrinosolvens* y *Coprococcus eutactus* fueron abundantes en portadores de ST3^{8,36}. Pacientes

colonizados estaban enriquecidos por especies *Faecalibacterium* y *Ruminococcaceae*; mientras que, en no colonizados, predominaban especies del género *Enterococcus* (*E. hirae*, *E. faecalis*, *E. durans*)⁹. Los resultados sugieren una relación simbiótica y regulación equilibrada del microbioma debido a *Blastocystis* spp. Las relaciones negativas también son evidentes. En pacientes con SII colonizados por *Blastocystis* spp. se observó una disminución *Bifidobacterium* spp. En individuos sanos colonizados encontraron una disminución de *F. prausnitzii*⁸. La disminución de *F. prausnitzii* puede generar desórdenes inflamatorios porque regula la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12 y TNF- α)⁸. Asimismo, ST7 se asocia a menor diversidad bacteriana en pacientes con diarrea¹⁰. Estudios sugieren que *Blastocystis* spp. no induce disbiosis intestinal³⁷, aunque ciertos subtipos (ST3) podrían influir sobre el metabolismo de nucleótidos, cofactores y vitaminas³⁴. La interacción entre *Blastocystis* spp. y el microbioma intestinal es complejo y bidireccional. Estos hallazgos sugieren la necesidad de investigaciones adicionales que exploren las características genotípicas y fenotípicas de este protozoo y sus interacciones con la composición microbiana intestinal.

Variabilidad global y clínica de los subtipos de *Blastocystis* spp.

El análisis sobre la prevalencia y distribución de *Blastocystis* spp. a nivel mundial revela una compleja variación entre los genotipos y la ubicación geográfica. Es importante destacar que los subtipos más frecuentes son: ST1, ST2, ST3 y ST4²; aunque se han encontrado otros subtipos en menor proporción. Esta versatilidad refleja el impacto clínico de investigaciones sobre su diversidad genética para establecer medidas de diagnóstico y prevención. A continuación, se sintetiza la prevalencia de los genotipos de *Blastocystis* spp.

Continentes	Subtipo y Prevalencia					Referencia
	ST1	ST2	ST3	ST4	OTROS	
América						
México	14,89%	8,51%	29,79%	16,84%	ST5 (5,26%) ST7 (12,63%)	(2)
Colombia	45%	26%	18%	4%	ST6 (2%) ST7 (4%)	(25)
Brasil	9%	32,5%	36%	-	ST7 (4,5%) ST8 (9%)	(25)
Ecuador	12%	-	84%	-	-	(25)
Perú	-	-	92%	-	-	(25)
Bolivia	-	32,5%	30%	-	ST5 (20%) ST12 (7,5%)	(25)
Argentina	17%	15%	63%	-	ST6 (5%)	(25)
Europa						
Francia	20%	12,8%	43,3%	20%	ST6 y ST7 (2,1%)	(31)
España	13,2%	62,3%	17%	7,5%	-	(3)
Italia	25%	22,2%	36,1%	16,6%	-	(38)
República Checa	19%	16%	36%	-	-	(39)
Polonia	13,1%	19,7%	59%	-	ST6 (3,3%) ST7 (3,3%)	(40)
África						

Senegal	24,9%	49,9%	23,6%	-	ST7 (3,07%) ST10 y ST14 (2,045%)	(20)
Túnez	30%	16%	51%	1,6%	ST7 (1,6%)	(41)
Egipto	39,5%	10,8%	48,3%	1,1%	ST10 (0,3%)	(42)
Guinea	33%	22,7%	40,2%	0,7%	ST14 (3,4%)	(43)
Asia						
China	28,41%	5,08%	61,17%	-	-	(44)
Irán	22%	6%	40%	2%	ST5 (8%)	(21)
Tailandia	52,2%	4,9%	36,6%	6,5%	-	(44)
Indonesia	47,1%	0,9%	43,3%	-	ST7 (8,5%)	(44)
Malasia	27,16%	8,45%	52,51%	1,2%	ST6 (5,43%) ST7 (3,42%)	(44)
India	6,6%	-	93,3%	-	-	(44)
Nepal	37,96%	-	5,5%	-	ST6 (43,51%) ST7 (9,25%)	(44)
Oceanía						
Australia	33%	3,81%	47,32%	9,16%	ST5 (2,29%) ST6 (2,29%) ST7 (0,76%) ST8 (1,52)	(44)

Tabla 1. Prevalencia de ST de *Blastocystis* spp. en diferentes continentes del mundo.

Como evidencia la información sintetizada en **Tabla 1**, la distribución de los subtipos de *Blastocystis* spp. presentan variabilidad significativa en los cinco continentes, con el subtipo ST3 identificado como el más predominante a nivel mundial. Sin embargo, se observan patrones a nivel regional y diferencias concretas que enfatizan las interacciones genéticas, ambientales y zoonóticas.

América.

- **México:** El subtipo ST3 fue el de mayor incidencia, sin embargo, se hallaron asociaciones entre ST1 y dolor abdominal (OR: 0,196) y ST4 con distensión abdominal (OR: 0,2928)².
- **Resto de América:** Los subtipos ST3 y ST1 se mantienen como los más frecuentes. En Colombia, ST1 lidera en prevalencia, mientras que en Bolivia es el subtipo ST2; destacando patrones similares en otras regiones del mundo. Las manifestaciones clínicas son síntomas gastrointestinales clásicos: diarrea, dolor y distensión abdominal²⁵.

Europa.

- **España:** El subtipo ST2 se identificó como el de mayor prevalencia, manifestándose principalmente con la sintomatología gastrointestinal característica, que incluyen los síntomas típicos asociados a esta variante³.
- **Resto de Europa:** La alta prevalencia de ST3 se mantiene en el resto de países europeos, y los síntomas más frecuentes fueron: dolor abdominal, diarrea, flatulencias, estreñimiento y vómitos^{31,39,40}. En casos específicos, se reportaron manifestaciones extraintestinales como astenia, pérdida de apetito, tos productiva y eosinofilia, aunque no están claros los mecanismos vinculados a estos síntomas³⁸.

África, Asia y Oceanía.

- **África del Norte y Subsahariana:** En regiones como Túnez, Egipto y Guinea, se registraron casos de urticaria relacionados a infecciones por *Blastocystis* spp⁴¹⁻⁴⁴. En Senegal, al igual que España y Bolivia, ST2 fue el genotipo más frecuente²⁰.
- **Asia y Oceanía:** Nepal destaca por la prevalencia del subtipo ST6, relacionado posiblemente a una transmisión zoonótica, lo que sugiere un patrón único en esta región. En Tailandia e Indonesia ST1 muestra predominancia, con síntomas similares a los reportados en otras regiones^{25,44}.

En países como España, Senegal y Bolivia, subtipos como ST2, ST5 y ST7 han mostrado incidencia significativa, asociándose tanto a manifestaciones gastrointestinales como cutáneas^{3,20,25}. Se han reportado casos esporádicos de subtipos poco frecuentes, como ST8, ST10, ST12 y ST14, lo que refuerza la hipótesis de que un proceso de transmisión zoonótico podría estar involucrado en la transmisión de la infección^{25,44}. La amplia diversidad genética de *Blastocystis* spp. evidencia su capacidad de adaptación evolutiva, factores que contribuyen significativamente a su persistencia en diferentes entornos y huéspedes.

Blastocystis spp: ¿comensal o patógeno?

La patogenicidad de *Blastocystis* spp. es un tema ampliamente debatido en la comunidad científica, con múltiples estudios que han descubierto mecanismos de virulencia y patogenicidad asociados a este parásito^{1,22}. Destaca su capacidad para modular la respuesta inmunológica del huésped y evadirla. La secreción de cisteín proteasas contribuye al daño tisular e interfieren con la función de inmunoglobulinas y proteínas esenciales en la respuesta inmune. Además, presenta mecanismos de resistencia frente condiciones adversas, lo que podría explicar su persistencia en el huésped y las manifestaciones clínicas observadas en individuos infectados⁶.

Mecanismos inmunopatogénicos de *Blastocystis* spp: evasión inmunológica y daño celular.

La respuesta inmune del huésped y los mecanismos de defensa del parásito son claves para comprender su patogenicidad¹. Estudios han revelado que individuos colonizados presentan niveles bajos de IgA fecal y menor recuento de neutrófilos en sangre respecto a individuos no colonizados, sugiriendo un impacto inmunomodulador del parásito¹⁹. Esta capacidad puede ser explicada por la producción de serina proteasas que degradan la IgA secretora (sIgA), permitiendo al parásito evadir la respuesta inmune y asegurar su supervivencia¹⁹.

Se ha evidenciado que *Blastocystis* spp. puede inducir apoptosis mediante mecanismos dependientes de caspasas^{1,45}. Por ejemplo, en estudios realizados con aislados zoonóticos WR1 (cepa salvaje) de *B. ratti*, se observó apoptosis en células IEC-6 (línea celular no transformada del epitelio intestinal de rata), aumentando la permeabilidad intestinal, disminución de la resistencia eléctrica transepitelial, y redistribución de F-actina^{1,45}. Asimismo, las cisteín proteasas de este parásito inducen la secreción de IL-8 en la mucosa intestinal y participan en la expresión de serina proteasas y glicosiltransferasas que exacerban el daño intestinal²².

En modelos murinos, se observó infiltración de células inflamatorias en la submucosa, hiperplasia de células caliciformes y un aumento en la expresión de IL-12, TNF- α e IFN- γ modulada por linfocitos Th1¹⁹. En particular, el subtipo 7 de *Blastocystis* spp. induce la expresión de IL-1 β e IL-6 mediante la activación de proteínas quinasa activadas por mitógenos, lo que refuerza su asociación con respuestas inflamatorias¹⁹.

Estudios in vitro con células epiteliales de colon expuestas a la cepa *Blastocystis Nand II*, detectaron la liberación de IL-8, GM-CSF y la activación de NF-kB en aislados zoonóticos del subtipo ST4⁵. De manera similar, el subtipo ST7 regula negativamente la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), degrada la IgA y presenta una alta capacidad de adhesión y colonización asociada a la mucina, lo que provoca daño tisular^{5,29}.

Impacto de las cisteín proteasas en la integridad intestinal.

Blastocystis spp. interactúa con las células epiteliales intestinales, lo que aumenta su permeabilidad y provoca procesos apoptóticos^{6,22}. Las cisteín proteasas (CP) destacan como principales marcadores de virulencia debido a su actividad lítica versátil⁶. En *Blastocystis* spp, se ha identificado Blastopain-1, una CP activada por leguminosas, que ejerce efectos nocivos en la integridad y supervivencia de los enterocitos⁶.

La concentración de CP varía según el subtipo del parásito, y es notable en ST4 (47%) y ST7 (39%)⁶. Estudios en monocapas de células intestinales murinas (IEC-6), han demostrado que ST4 induce alteraciones de la permeabilidad intestinal, reorganización en los filamentos de actina del citoesqueleto y apoptosis independiente del contacto^{6,22}. La activación de CP estimula la secreción de IL-8 a través de la vía del NF-κB, y activa la actividad de la caspasa 3, causando daños a los enterocitos^{5,22}.

En estudios con células de adenocarcinoma colorrectal humano (CaCo-2), las CP de ST4 no alteraron la permeabilidad intestinal, mientras que ST7 provocó apoptosis y aumento en la expresión de caspasas 3 y caspasas 9^{6,46}. De igual manera, la catepsina B, una CP relevante de *Blastocystis* spp. causa daños a nivel intestinal⁴⁷. En experimentos con sobrenadantes de cultivos del subtipo ST7, la actividad recombinante de esta CP con leguminosa evidenció efectos patogénicos al comprometer la función intestinal⁴⁶.

Los diferentes hallazgos inmunomoduladores y los complejos mecanismos de interacción entre el huésped y el parásito destacan el potencial de *Blastocystis* spp. en procesos inflamatorios y patogénicos. Asimismo, se requieren más estudios relacionados con el papel crítico de las cisteín proteasas en la inducción del daño tisular y producción de citocinas proinflamatorias.

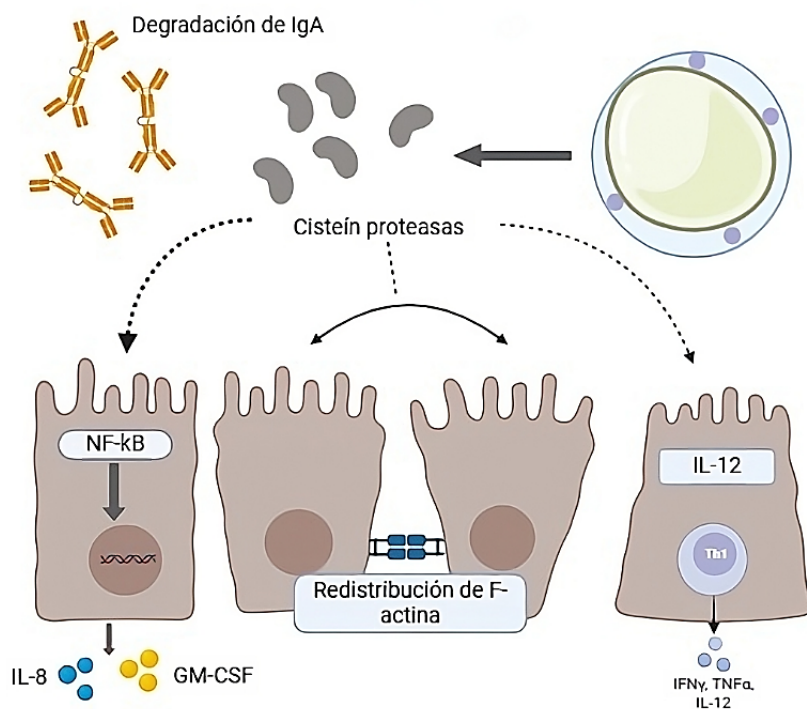


Figura 2. Modulación inmunitaria de *Blastocystis* spp. y mecanismos de patogenicidad. Esta ilustración simplifica la capacidad *Blastocystis* spp. para evadir la respuesta inmune mediante IgA proteasas. *Blastocystis* pueden inducir la expresión de citocinas proinflamatorias mediante la respuesta de células Th1. La actividad de cisteín proteasas activan la vía del NF-κB y la producción de sus respectivas citocinas. IgA: inmunoglobulina A, NF-κB: factor nuclear κB, F-actina: filamentos de actina, IL: interleucina, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IFNγ: interferón gamma, TNFα: factor de necrosis tumoral alfa.

Resistencia de *Blastocystis* spp. a métodos de tratamiento del agua.

Blastocystis spp. puede transmitirse por diversas vías, entre ellas la fecal-oral mediante alimentos y agua contaminada¹. La transmisión hídrica ha captado el interés científico debido a la detección de este parásito en agua potable, lluvia, y en sistemas de filtración o cloración¹¹. Un estudio sobre la resistencia de *Blastocystis* (ST1 a ST9) ante agentes como el Cl y H₂O₂ relevó notable supervivencia en todos los subtipos¹¹. El genotipo ST8 mostró mayor sensibilidad al cloro (140,3 ppm), y ST1 una mayor resistencia (1268 ppm). Respecto al H₂O₂, ST5 presentó mayor sensibilidad al H₂O₂ (72,8 ppm) y ST9 fue el más resistente (946,6 ppm)¹¹.

La resistencia de *Blastocystis* spp. al H₂O₂ se debe a la regulación positiva de las proteínas SufB y SufC, además de sistemas hierro/azufre citosólicos, que le permiten manejar el estrés oxidativo¹¹. En el caso del cloro, los subtipos resistieron concentraciones entre 175 ppm – 1800 ppm¹¹, valores superiores a la concentración utilizada para el tratamiento del agua potable que oscila entre 0,2 ppm – 5,0 ppm según la normativa local^{11,48}. Estos resultados evidencian la necesidad de mejoras en las estrategias de desinfección del agua potable para garantizar su efectividad contra patógenos como *Blastocystis* spp.

Ineficacia del metronidazol y la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas.

El metronidazol, a pesar de ser el tratamiento de primera línea para infecciones por *Blastocystis*, puede presentar ineficacia¹². En estudios con aislados ST3 expuestos a una concentración de 0,001 mg/mL del fármaco, se obtuvo un aumento del recuento parasitario (formas amebianas), procesos apoptóticos, elevada actividad de cisteín proteasas, y proliferación de células cancerosas en cultivos con células de cáncer de colon HCT 116¹². El fracaso terapéutico se relaciona con la ausencia de genes *nim* y *ntr* responsables de la activación e inactivación tóxica del metronidazol dentro del parásito¹².

Investigaciones en pacientes con esquizofrenia grave se identificaron formas amebianas de este protozooario resistentes al metronidazol, asociadas con altos niveles de cisteín y serina proteasas y aumento en el recuento de células cancerosas en modelos HCT 116⁴⁹. Estas evidencias enfatizan la necesidad de reevaluar la administración y dosificación del tratamiento con metronidazol, o explorar terapias alternativas que eliminen la infección sin generar efectos adversos^{12,49}.

Métodos diagnósticos: de lo convencional a lo molecular.

Métodos convencionales.

El diagnóstico clínico de *Blastocystis* spp. enfrenta varios desafíos debido a la ausencia de signos patognómicos específicos¹. Es fundamental un abordaje diferencial exhaustivo apoyado en técnicas convencionales como la microscopía óptica para detectar directamente el parásito en muestras fecales¹. En la práctica clínica, la observación en fresco con solución salina o tinciones como Lugol, Giemsa y Tricrómica facilitan la identificación estructural de *Blastocystis* spp. del resto de elementos celulares^{1,14}. No obstante, la diversidad morfológica de este parásito limita la precisión de este método, con una sensibilidad del 34% y especificidad del 100%^{1,15,50}.

Métodos moleculares.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su variante en tiempo real (qPCR), permiten la identificación precisa del parásito y de sus genotipos, superando las limitaciones de los métodos tradicionales¹⁴. Estas técnicas amplifican genes SSU 18s rRNA mediante el uso de cebadores específicos según el subtipo¹⁴. Estas técnicas presentan algunas limitaciones, por ejemplo, el proceso de extracción de ADN mediante métodos automatizados suele negativizar ante una baja carga parasitaria⁵⁰; requiriendo una cantidad mínima de material genético (8 femtogramos) o 4 formas vegetativas para *Blastocystis* spp¹⁴.

La detección por biología molecular reduce el riesgo de contaminación cruzada y ofrece resultados cuantitativos. Además, al detectar directamente el material genético del parásito, se evita obtener resultados falsos negativos debido a su elevada sensibilidad (84%) y especificidad (98%)⁵⁰.

Métodos microbiológicos.

Los cultivos axénicos, pese a tener sensibilidad y especificidad superiores al 90%, son menos accesibles por su costo y complejidad técnica. Este método permite explorar la patogenicidad, las variaciones fenotípicas

entre subtipos y evaluar efectos farmacológicos^{13,15}. El aislamiento axénico requiere condiciones especiales para su aplicación: tratamiento con antibióticos, cultivos monoclonales, centrifugación diferencial y separación de gradiente según el uso de medios de cultivo. In vitro, los cultivos pueden ser monofásicos y bifásicos, que utilizan medios sólidos (agar) y medios líquidos: medio Jones, medio IMDM y medio DMEM¹⁵.

Un estudio evaluó variaciones morfométricas entre subtipos de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Los subtipos ST1, ST2, ST3 y ST6 aislados en cultivo DMEM, mostraron un diámetro entre 5 – 185 μm , siendo ST1 el más pequeño, seguido de ST6 y ST2. El subtipo ST3 mostró tamaños y fenotipos variables, formas ameboides y agrupaciones parasíticas en las muestras provenientes de pacientes sintomáticos¹³.

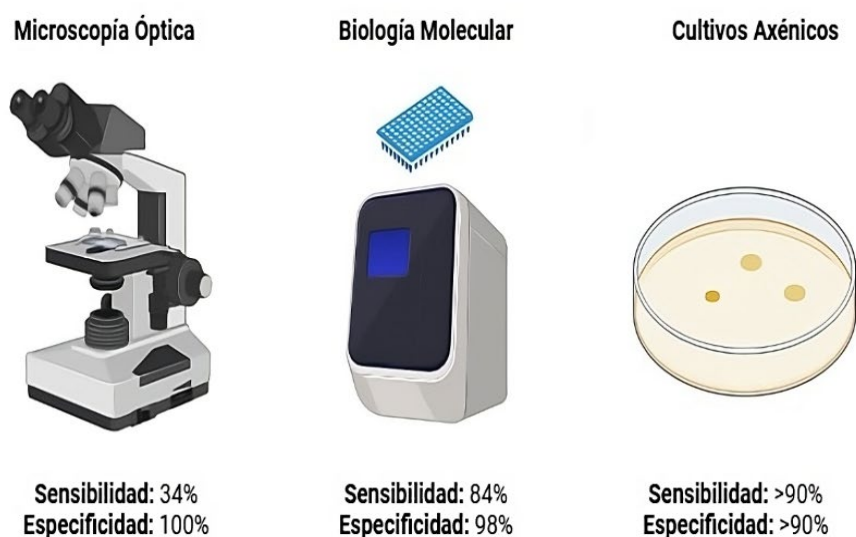


Figura 3. Comparación de métodos de detección de *Blastocystis* spp.

En el laboratorio clínico, los métodos comunes por microscopía para la detección de *Blastocystis* son ampliamente utilizados. No obstante, debido a su limitada sensibilidad, se han optado por métodos de biología molecular y medios de cultivo axénicos para la identificación específica de este parásito. Pese a ello, implementar estos métodos es difícil por su coste y capacitación del personal, por lo que su uso está destinado al campo de la investigación¹.

El estudio de *Blastocystis* spp. continúa presentando retos y oportunidades significativas en la investigación de enfermedades parasitarias. La amplia diversidad genética de este protozoo resalta la necesidad de enfoques integrales que aborden tanto sus implicaciones clínicas como sus interacciones con el microbioma intestinal. Los avances en biología molecular y técnicas de cultivo han permitido caracterizar sus subtipos y mecanismos de virulencia, pero persisten interrogantes clave sobre su impacto patogénico y su relación bidireccional con el huésped.

Además, la resistencia de *Blastocystis* spp. a agentes químicos y farmacológicos subraya la importancia de innovar en estrategias diagnósticas y terapéuticas. Mientras los métodos actuales ofrecen información valiosa, el desarrollo de herramientas más precisas y accesibles será crucial para comprender plenamente su papel en la salud humana y mejorar los abordajes clínicos y de saneamiento. La colaboración interdisciplinaria entre investigadores y clínicos será esencial para enfrentar los desafíos emergentes relacionados con este microorganismo y su entorno.

CONCLUSIONES

La diversidad genética de *Blastocystis* spp. es amplia y variable en varias regiones del mundo, destacando los subtipos ST1, ST2, ST3 y ST4. El subtipo 3 prevalece en todos los continentes, mientras que la predominancia de subtipos infrecuentes (ST6) en países como Nepal sugiere un notable potencial adaptativo de este protozoo al tracto intestinal humano, favorecido por procesos zoonóticos. Los mecanismos de virulencia y

patogenicidad, como la evasión inmunitaria mediante la degradación de sIgA y el daño celular provocado por cisteín proteasas, explican la sintomatología gastrointestinal y su compleja interacción con el huésped. La relación bidireccional con la microbiota subraya la influencia de la composición bacteriana, especialmente con ST1, ST2, ST3, ST4 y ST7. El hallazgo de resistencia ante agentes químicos (Cl y H₂O₂) y farmacológicos (metronidazol) expone serios desafíos terapéuticos y de saneamiento, resaltando la necesidad de replantear estrategias de control sanitario. Estos descubrimientos justifican la implementación de técnicas diagnósticas más sensibles y específicas. Para futuras investigaciones, las evidencias presentadas abren líneas prometedoras orientadas hacia la identificación de biomarcadores, comprensión de mecanismos patogénicos, y desarrollo de estrategias para el manejo y prevención de *Blastocystis* spp.

Materiales suplementarios: No aplica.

Contribuciones de los autores: Diseño del trabajo, OO; Recolección de datos, OO; Análisis de datos, OO; Revisión Bibliográfica, OO y CY; Preparación del manuscrito, OO y CY; Revisión final, OO y CY.

Financiación: Este artículo no recibió financiación externa.

Declaración del Comité de Revisión Institucional: No aplica.

Declaración de consentimiento informado: No aplica.

Declaración de disponibilidad de datos: No aplica.

Agradecimientos: No aplica.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. del Coco VF, Molina NB, Basualdo JA, Córdoba MA. Blastocystis spp.: Advances, controversies and future challenges. Rev Argent Microbiol. 2017;49(1):110–8.
2. Pérez MR, Yáñez CM, Hernández AM, Sustaita JJD, Jiménez EG, Andrade MR, et al. Blastocystis infection frequency and subtype distribution in university students. Heliyon. 2020;6(12):0–5.
3. Paulos S, Köster PC, de Lucio A, Hernández-de-Mingo M, Cardona GA, Fernández-Crespo JC, et al. Occurrence and subtype distribution of Blastocystis sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. Zoonoses Public Health. 2018;65(8):993–1002.
4. Tapia-Veloz E, Gozalbo M, Guillén M, Dashti A, Bailo B, Köster PC, et al. Prevalence and associated risk factors of intestinal parasites among schoolchildren in Ecuador, with emphasis on the molecular diversity of Giardia duodenalis, Blastocystis sp. and Enterocytozoon bienensei. PLoS Negl Trop Dis. 2023;17(5):1–21.
5. Sardinha-Silva A, Alves-Ferreira EVC, Grigg ME. Intestinal immune responses to commensal and pathogenic protozoa. Front Immunol. 2022;13(September):1–17.
6. Argüello-García R, Carrero JC, Ortega-Pierres MG. Extracellular Cysteine Proteases of Key Intestinal Protozoan Pathogens—Factors Linked to Virulence and Pathogenicity. Int J Mol Sci. 2023;24(16).
7. Aykur M, Malatyali E, Demirel F, Cömert-Koçak B, Gentekaki E, Tsaousis AD, et al. Blastocystis: A Mysterious Member of the Gut Microbiome. Microorganisms. 2024;12(3):1–19.
8. Deng L, Wojciech L, Gascoigne NRJ, Peng G, Tan KSW. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. PLoS Pathog [Internet]. 2021;17(2):1–15.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009253>

9. Kim MJ, Lee YJ, Kim TJ, Won EJ. Gut microbiome profiles in colonizations with the enteric protozoa blastocystis in korean populations. *Microorganisms*. 2022;10(1):1–9.
10. Deng L, Lee JWJ, Tan KSW. Infection with pathogenic Blastocystis ST7 is associated with decreased bacterial diversity and altered gut microbiome profiles in diarrheal patients. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2022;15(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05435-z>
11. Martín-Escolano R, Ng GC, Tan KSW, Stensvold CR, Gentekaki E, Tsaousis AD. Resistance of Blastocystis to chlorine and hydrogen peroxide. *Parasitol Res*. 2023;122(1):167–76.
12. Rajamanikam A, Hooi HS, Kudva M, Samudi C, Kumar S. Resistance towards metronidazole in Blastocystis sp.: A pathogenic consequence. *PLoS One*. 2019;14(2):1–16.
13. Karamati SA, Mirjalali H, Niyiyati M, Rezaei Riabi T, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Comprehensive study of phenotypic and growth rate features of blastocystis subtypes 1-3 and 6 in symptomatic and asymptomatic subjects. *Iran J Parasitol*. 2019;14(2):204–13.
14. Ysea MAV, Umaña MC, Fuentes SP, Campos IV, Carmona MC. Standardization of molecular techniques for the detection and characterization of intestinal protozoa and other pathogens in humans. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2022;28:1–14.
15. Mei X, Wei L, Su C, Yang Z, Tian X, Zhang Z, et al. Advances in the axenic isolation methods of Blastocystis sp. and their applications. *Parasitology*. 2024;151(2):125–34.
16. Ragavan ND, Govind SK, Chye TT, Mahadeva S. Phenotypic variation in Blastocystis sp. ST3. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):2–11.
17. Nemati S, Falahati Anbaran M, Mohammad Rahimi H, Hosseini MS, Aghaei S, Khalili N, et al. Evolutionary and phylogenetic analyses of the barcoding region suggest geographical relationships among Blastocystis sp., ST3 in humans. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2021;96(February):105151. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105151>
18. Jiménez P, Muñoz M, Ramírez JD. An update on the distribution of Blastocystis subtypes in the Americas. *Heliyon*. 2022;8(12).
19. Rojas-Velázquez L, Morán P, Serrano-Vázquez A, Portillo-Bobadilla T, González E, Pérez-Juárez H, et al. The regulatory function of Blastocystis spp. on the immune inflammatory response in the gut microbiome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(August):1–9.
20. Khaled S, Gantois N, Ly AT, Senghor S, Even G, Dautel E, et al. Prevalence and subtype distribution of blastocystis sp. In senegalese school children. *Microorganisms*. 2020;8(9):1–17.
21. Khademvatan S, Masjedizadeh R, Yousefi-Razin E, Mahbodfar H, Rahim F, Yousefi E, et al. PCR-based molecular characterization of Blastocystis hominis subtypes in southwest of Iran. *J Infect Public Health* [Internet]. 2018;11(1):43–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.03.009>
22. Kumarasamy V, Anbazhagan D, Subramaniyan V, Vellasamy S. Blastocystis sp., Parasite Associated with Gastrointestinal Disorders: An Overview of its Pathogenesis, Immune Modulation and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des*. 2018;24(27):3172–5.
23. Jiménez PA, Jaimes JE, Ramírez JD. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>
24. Hernández PC, Maloney JG, Molokin A, George NS, Morales L, Chaparro-Olaya J, et al. Exploring Blastocystis genetic diversity in rural schoolchildren from Colombia using next-generation amplicon sequencing reveals significant associations between contact with animals and infection risk. *Parasitol*

- Res. 2023;122(7):1451–62.
25. 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* [Internet]. 2016;41:32–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>
 26. Skotarczak B. Genetic diversity and pathogenicity of blastocystis. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(3):411–6.
 27. Das R, Khalil S, Mirdha BR, Makharia GK, Dattagupta S, Chaudhry R. Molecular characterization and subtyping of blastocystis species in irritable bowel syndrome patients from north India. *PLoS One*. 2016;11(1):1–9.
 28. Fontanelli Sulekova L, Gabrielli S, Furzi F, Milardi GL, Biliotti E, De Angelis M, et al. Molecular characterization of Blastocystis subtypes in HIV-positive patients and evaluation of risk factors for colonization. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–7.
 29. Ajjampur SSR, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KSW. Ex vivo and in vivo mice models to study blastocystis spp. adhesion, colonization and pathology: Closer to proving Koch's postulates. *PLoS One*. 2016;11(8):1–17.
 30. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Alonso C, Santos J, Fuentes I, et al. Epidemiological and clinical profile of adult patients with Blastocystis sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1827-4>
 31. El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite Blastocystis sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1776-8>
 32. Sheela DS, Chandramathi S, Suresh K. Epitope variances demonstrated by blastocystis sp. ST3 symptomatic and asymptomatic isolates. *Trop Biomed*. 2020;37(1):210–7.
 33. Bahrami F, Babaei E, Badirzadeh A, Riabi TR, Abdoli A. Blastocystis, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(6):1027–42.
 34. Rajamanikam A, Isa MNM, Samudi C, Devaraj S, Govind SK. Gut bacteria influence Blastocystis sp. phenotypes and may trigger pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2023;17(3):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0011170>
 35. Mayneris-Perxachs J, Arnoriaga-Rodríguez M, Garre-Olmo J, Puig J, Ramos R, Trelis M, et al. Presence of Blastocystis in gut microbiota is associated with cognitive traits and decreased executive function. *ISME J*. 2022;16(9):2181–97.
 36. Huang LS, Yeh YM, Chiu SF, Huang PJ, Chu LJ, Huang CY, et al. Intestinal microbiota analysis of different Blastocystis subtypes and Blastocystis-negative individuals in Taiwan. *Biomed J* [Internet]. 2023;(October):100661. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2023.100661>
 37. Castañeda S, Muñoz M, Villamizar X, Hernández PC, Vásquez LR, Tito RY, et al. Microbiota characterization in Blastocystis-colonized and Blastocystis-free school-age children from Colombia. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2020;13(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04392-9>
 38. Marangi M, Boughattas S, De Nittis R, Pisanelli D, delli Carri V, Lipsi MR, et al. Prevalence and genetic diversity of Blastocystis sp. among autochthonous and immigrant patients in Italy. *Microb Pathog* [Internet]. 2023;185(October):106377. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106377>

39. Lhotská Z, Jirků M, Hložková O, Brožová K, Jirsová D, Stensvold CR, et al. A Study on the Prevalence and Subtype Diversity of the Intestinal Protist Blastocystis sp. in a Gut-Healthy Human Population in the Czech Republic. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(October):1–14.
40. Rudzińska M, Kowalewska B, Wąż P, Sikorska K, Szostakowska B. Blastocystis subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland – A single center study. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;75(June):103926. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>
41. Ben Abda I, Maatoug N, Ben Romdhane R, Bouhelmi N, Zallegua N, Aoun K, et al. Prevalence and subtype identification of Blastocystis sp. in healthy individuals in the Tunis Area, Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):202–4.
42. Naguib D, Gantois N, Desramaut J, Arafat N, Mandour M, Abdelmaogood AKK, et al. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of the Enteric Protozoan Parasite Blastocystis sp. in the Northern Egypt Population. *Pathogens.* 2023;12(11):1–13.
43. Guilavogui T, Gantois N, Even G, Desramaut J, Dautel E, Denoyelle C, et al. Detection, Molecular Identification and Transmission of the Intestinal Protozoa Blastocystis sp. in Guinea from a Large-Scale Epidemiological Study Conducted in the Conakry Area. *Microorganisms.* 2022;10(2).
44. Nemati S, Zali MR, Johnson P, Mirjalali H, Karanis P. Molecular prevalence and subtype distribution of Blastocystis sp. In Asia and in Australia. *J Water Health.* 2021;19(5):687–704.
45. Kapczuk P, Kosik-Bogacka D, Kupnicka P, Metryka E, Simińska D, Rogulska K, et al. The influence of selected gastrointestinal parasites on apoptosis in intestinal epithelial cells. *Biomolecules.* 2020;10(5).
46. Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, Livrelli V, Viscogliosi E, Delbac F, et al. On Blastocystis secreted cysteine proteases: A legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology.* 2016;143(13):1713–22.
47. Gonzalez-Arenas NR, Villalobos G, Vargas-Sanchez GB, Avalos-Galarza CA, Marquez-Valdelamar LM, Ramirez-Miranda ME, et al. Is the genetic variability of Cathepsin B important in the pathogenesis of Blastocystis spp.? *Parasitol Res.* 2018;117(12):3935–43.
48. Lee GO, Whitney HJ, Blum AG, Lybik N, Cevallos W, Trueba G, et al. Household coping strategies associated with unreliable water supplies and diarrhea in Ecuador, an upper-middle-income country. *Water Res* [Internet]. 2020;170:115269. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115269>
49. Franklin F, Rajamanikam A, Raju CS, Gill JS, Francis B, Sy-Cherng LW, et al. Higher amoebic and metronidazole resistant forms of Blastocystis sp. seen in schizophrenic patients. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2022;15(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05418-0>
50. Nourrisson C, Brunet J, Flori P, Moniot M, Bonnin V, Delbac F, et al. Comparison of DNA extraction methods and real-time PCR assays for the detection of blastocystis sp. in stool specimens. *Microorganisms.* 2020;8(11):1–8.

Received: October 23, 2024 / Accepted: November 30, 2024 / Published: December 15, 2024

Citation: Yauli Flores CF, Olmos Almachi OF. Diversidad genética de *Blastocystis spp.*: actualización sobre su virulencia y patogenicidad. *Bionatura Journal.* 2024;1(2):10. doi: 10.70099/BJ/2024.01.02.10

Additional information Correspondence should be addressed to oolmos5098@uta.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

ISSN.3020-7886

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura Journal stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).