



Universidad del
Rosario

Cambios en el bacterioma y eucarioma intestinal en pacientes con *Blastocystis* y *Clostridium difficile*.

Laura Camila Vega Romero

Director

Juan David Ramírez González (PhD.)

Codirectora

Claudia Marina Muñoz (PhD.)

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Bióloga

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Pregrado en Biología. Universidad del Rosario

Bogotá, 2020

TÍTULO: CAMBIOS EN EL BACTERIOMA Y EUCARIOMA INTESTINAL EN PACIENTES CON *Blastocystis* Y *Clostridium difficile*.

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Amplificación de ADN fecal para detección de <i>Blastocystis</i> y subtipificación	6
Amplificación, secuenciación (Illumina) de los genes 16S-ARNr y 18S-ARNr y análisis bioinformático	7
Análisis estadísticos	8
RESULTADOS	9
Descripción de los grupos de estudio	9
Frecuencias relativas de los subtipos de <i>Blastocystis</i>	10
Descripción de la composición del bacterioma de los grupos de estudio	12
Descripción de la composición del eucarioma de los grupos de estudio	15
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	18
AGRADECIMIENTOS	24
REFERENCIAS	24
ANEXOS	30

CAMBIOS DEL BACTERIOMA Y EUCARIOMA INTESTINAL EN PACIENTES CON *Blastocystis* Y *Clostridium difficile*

Laura Camila Vega Romero (Autor), Claudia Marina Muñoz (Codirectora de tesis), Giovanni Herrera (Asesor), Juan David Ramírez* (Director de tesis)

*Autor de correspondencia: juand.ramirez@urosario.edu.co

RESUMEN

Dentro de los millones de microorganismos que componen la microbiota intestinal, *Clostridium difficile* y *Blastocystis* pueden tener un efecto modulador en diferentes maneras. El siguiente estudio tuvo como objetivo la descripción del bacterioma y eucarioma de cuatro grupos de pacientes: con coinfección por *Blastocystis* y *C. difficile*, infección únicamente por *C. difficile*, colonización únicamente por *Blastocystis* y pacientes libres de colonización/infección por estos microorganismos. Así mismo, se identificaron los subtipos de *Blastocystis* dentro de las muestras usando “amplicon sequencing” de los genes 16S-ARNr y 18S-ARNr. Los resultados obtenidos muestran que los subtipos más abundantes de *Blastocystis* fueron: ST1 (36,4%), ST3 (37,5%) y ST5 (19,3%). Aunque se ha propuesto que los ambientes de disbiosis previenen la colonización por *Blastocystis*, este estudio mostró una posible adaptación de *Blastocystis* a este escenario; gracias a los mecanismos de su hidrogenosoma y a los recursos que puede encontrar en este ambiente. De acuerdo con los resultados obtenidos, las diferencias significativas sobre la composición del bacterioma y eucarioma de los cuatro grupos se presentó sólo dentro de algunos géneros evaluados en el estudio. De esta manera, *Blastocystis* puede favorecer el aumento de poblaciones de bacterias benéficas de la microbiota, al cumplir con su rol predatorio. Lo anterior, ayudaría a esclarecer el estatus debatible de *Blastocystis*, inclinándose hacia la hipótesis de que podría ser un miembro benéfico para la microbiota intestinal. El presente estudio también brinda una visión holística sobre la competencia que existe entre los miembros de la microbiota bajo un escenario de disbiosis, especialmente en la competencia por recursos entre *Blastocystis* y algunos hongos. Este estudio contribuye al conocimiento de la composición de la microbiota y la interacciones de sus miembros.

ABSTRACT

Within the thousands of microorganisms that make up the intestinal microbiota, *Clostridium difficile* and *Blastocystis* can have a modulatory effect in different ways. The following study aimed

to describe the bacteriome and eucariome of four patient groups: with *Blastocystis* and *Clostridium difficile*, only with infection by *C. difficile*, only with colonization by *Blastocystis* and patients without colonization/infection by the aforementioned microorganisms. Likewise, we identified *Blastocystis* subtypes in the samples, using amplicon sequencing of 16S-rRNA, 18S-rRNA. We found ST1 (36.4%), ST3 (37.5%) and ST5 (19.3%) as the most abundant subtypes of *Blastocystis* within the samples. Although it has been proposed that dysbiosis environments prevent the colonization by *Blastocystis*, this study showed a possible adaptation of *Blastocystis* to this scenario; due to the mechanisms of its hydrogenosome and to the resources that can be found in this environment. Hence, *Blastocystis* can favor the increasement of populations of beneficial bacteria of the microbiota, by performing its predatory role. Thus, our results would help clarify the debatable status of *Blastocystis*, leaning towards the hypothesis that it could be a beneficial member of the intestinal microbiota. The present study can also provide a holistic insight into the competition that exists among members of the microbiota under a scenario of dysbiosis, especially in the competition for resources between *Blastocystis* and some fungi. This study contributes to improve our knowledge about the composition of the intestinal microbiota and the interactions of its members.

PALABRAS CLAVE

Blastocystis, *Clostridium difficile*, bacterioma, eucarioma, disbiosis

KEY WORDS

Blastocystis, *Clostridium difficile*, bacteriome, eucarioma, dysbiosis

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal se define como el conjunto de taxa que conforman las comunidades microbianas del ambiente intestinal (microbioma). De esta manera, la definición incluye diferentes grupos de microorganismos como: bacterias, arqueas, eucariotas y virus (Marchesi & Rave, 2015; Cani, 2018). Se han descrito varios factores exógenos y endógenos que pueden generar variaciones en la composición del microbioma, lo que ha permitido considerar la microbiota intestinal como un potencial indicador de la salud del hospedero (Lynch & Pedersen, 2016; Shreiner et al., 2015). Sin embargo, los múltiples factores que pueden alterar la composición del microbioma hacen difícil establecer una causa directa sobre una composición en particular. Adicionalmente, la mayoría de los estudios sobre la microbiota se han centrado en el análisis de diferentes grupos de bacterias

(bacterioma), por lo que se ha dejado de lado el análisis de grupos de eucariotas (eucarioma), arqueas y virus (viroma); que pueden llegar a tener interacciones o roles importantes dentro del microbioma (Parfrey et al., 2014; Cani, 2018; Chudnovskiy et al., 2016).

En 2016, Gorvitovskaia et al. sugirió el uso del término de biomarcadores para describir aquellos taxa dominantes en el bacterioma, que tienen una correlación con la dieta o las enfermedades (Gorvitovskaia et al., 2016). Por ejemplo, se ha observado que *Faecalibacterium prausnitzii* exhibe efectos antiinflamatorios y su abundancia se reduce cuando hay enfermedad inflamatoria intestinal (Sokol, et al., 2018). Ahora bien, en el caso del eucarioma se ha observado que la colonización por parte de algunos protistas (*Blastocystis*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba*, *Endolimax*, etc.) es más común que lo que se pensaba. Estos microorganismos son denominados *Common Luminal Intestinal Parasitic Protists* (CLIPP) y son encontrados comúnmente en individuos con microbiota sana. No obstante, se ha sugerido que algunos CLIPPs pueden tener potencial patógeno y pueden estar relacionados con la salud intestinal. Esto los hace un objeto de estudio interesante, ya que pueden interactuar con otros miembros de la microbiota e influir en la salud del hospedero (Stensvold, 2019; Stensvold & van der giezen, 2018). Sin embargo, pocos estudios se han publicado al respecto.

Por otra parte, se ha sugerido el posible rol modulador de algunos miembros de la microbiota, este es el caso de la bacteria *Clostridium difficile* y el protista *Blastocystis*. La primera es una bacteria anaerobia y formadora de esporas, que cuenta con poblaciones hipervirulentas que pueden generar disbiosis de la microbiota gracias a la producción de toxinas. Además, presentan un alto contenido de elementos genéticos móviles que pueden favorecer la transferencia de genes asociados a resistencia a antibióticos (Abt et al., 2016; Mullany et al., 2015). Algunos autores han señalado que la infección por *C. difficile* (ICD) se relaciona con una disminución de algunos grupos de bacterias benéficas productoras de butirato, mientras se incrementan algunos grupos de bacterias patógenas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Milani et al., 2016).

Ahora bien, *Blastocystis* es un eucariota anaerobio que reside en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, este microorganismo exhibe una alta diversidad genética, lo que ha permitido clasificarlo en 17 subtipos que se distribuyen de manera variable a nivel global, y que pueden colonizar diferentes hospederos (Stensvold et al., 2007; Alfellani et al., 2013). En humanos se ha reportado la presencia del ST1 a ST9 (Alfellani et al., 2013) y del ST12 (Ramírez et al., 2016;

Jiménez et al., 2019), mientras que los ST5 y ST8 se encuentran comúnmente en mamíferos ungulados, ratas, aves y primates no humanos (Stensvold & Clark, 2016). Los estudios sobre el rol modulador de *Blastocystis* en la microbiota muestran resultados variables, dado que algunos relacionan la colonización por *Blastocystis* con una microbiota sana (Audebert et al., 2016), mientras que otros estudios lo encuentran relacionado con desordenes de la microbiota y algunas enfermedades gastrointestinales (Nourrisson et al., 2014). Es por lo anterior, que aún se sigue estudiando la relación de este eucariota con su hospedero, ya que no se ha establecido si es de naturaleza parasítica o comensalista (Scalan & Stensvold, 2013).

Los escenarios de disbiosis, caracterizados por la disminución de bacterias benéficas productoras de butirato, pueden prevenir la colonización por *Blastocystis* dado que generan un incremento en las concentraciones de oxígeno en el lumen intestinal (Stensvold & van der Giezen, 2018). Sin embargo, *Blastocystis* puede tener un mecanismo para soportar el estrés oxidativo en el intestino, lo que le permitiría colonizarlo bajo escenarios donde su supervivencia puede verse afectada (Tsaousis et al., 2018; Eme et al., 2017). Incluso es posible que algunos miembros de la microbiota puedan estar relacionados con la presencia de *Blastocystis*, al contribuir con la producción de algún metabolito que facilite su colonización en el intestino bajo estos escenarios. Actualmente, a nivel mundial no existen estudios que muestren la incidencia de coinfección por *C. difficile* y *Blastocystis*. Además, existe poca información sobre el estudio de la microbiota intestinal en Colombia, especialmente de estudios enfocados en la composición del eucarioma. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo la descripción de la composición del bacterioma y eucarioma intestinal de cuatro grupos de pacientes: con coinfección por *C. difficile* y *Blastocystis* (B+/CD+), pacientes con infección por *C. difficile* (B-/CD+), pacientes con colonización por *Blastocystis* (B+/CD-) y pacientes libres de infección (B-/CD-). Para nuestro estudio se espera encontrar un escenario de coinfección por *Blastocystis* y *C. difficile*, donde la presencia por *Blastocystis* pueda alterar la abundancia de algunos grupos de bacterias y eucariotas de la microbiota intestinal; esto con el fin de adaptarse a un escenario de disbiosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Amplificación de ADN fecal para detección de *Blastocystis* y subtipificación

El ADN de 154 muestras fecales usadas para este estudio fue colectado y extraído por Muñoz et al. (2018), durante un estudio dirigido a caracterizar la infección por *C. difficile* (ICD) en pacientes

con diarrea en Colombia. La extracción de ADN de las muestras se realizó con el *Stool DNA Isolation Kit* (Norgen, Biotek Corporation); y la detección molecular de *C. difficile* se realizó mediante dos protocolos de PCR convencional dirigidos al 16S-ARNr y al *gdh*, y un protocolo de PCR cuantitativa dirigida al 16S-ARNr (Muñoz et al., 2018). Para la detección de *Blastocystis* en las muestras fecales se amplificó la región hipervariable v4 del 18S-ARNr mediante PCR convencional. De esta manera, se usaron los primers F5 (5'-GGTCCGGTGAACACTTTGGATTT-3') y F2 (5'-CCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCA-3') (Stensvold, Ahmed et al., 2012), junto con el siguiente ciclo de PCR: denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 1 minuto y 72°C por 10 minutos, y extensión final a 72°C por 10 minutos. La presencia de *Blastocystis* se determinó al observar una banda de 119 pares de bases (pb) en gel de agarosa. Los datos de la detección de *Blastocystis* fueron cruzados con los datos de infección por *C. difficile* (ICD), lo que condujo al establecimiento de cuatro grupos de estudio: (1) coinfección (B+/CD+), (2) libres de infección (B-/CD-), (3) únicamente con colonización por *Blastocystis* (B+/CD-) y (4) únicamente con ICD (B-/CD+).

Las muestras con resultado positivo para *Blastocystis* fueron sometidas al protocolo de subtipificación descrito por Maloney et al. (2019). La abundancia relativa de los subtipos en cada muestra fue calculada considerando el número de lecturas obtenidas para cada unidad taxonómica operativa (OTU), con respecto al total de lecturas obtenidas.

Amplificación, secuenciación (Illumina) de los genes 16S-ARNr y 18S-ARNr y análisis bioinformático

Inicialmente, se amplificaron las regiones de los genes 16S-ARNr (bacterioma) y 18S-ARNr (eucarioma) en las 154 muestras, usando los primers de alta resolución 341F/806R (Yu et al., 2005) y 528F/706R (Cheung et al., 2010), respectivamente. Los tamaños del fragmento amplificado por los primers mencionados fueron de 466 pb y 179 pb, respectivamente. La amplificación anteriormente descrita y la secuenciación de las muestras fue realizada por una entidad independiente (Novogene, Bioinformatics Technology Co., Ltd, Beijing, China). Para este proceso, librerías de amplicones microbianos fueron construidas y subsecuentemente secuenciadas utilizando la plataforma Illumina Novaseq PE250, hasta alcanzar una profundidad mínima esperada de 500 mil lecturas por muestra. Una vez obtenidas las secuencias, tanto de bacterioma

como de eucarioma, se utilizó el software QUIIME (versión 2019.7) para demultiplexar dichas secuencias teniendo en cuenta los índices asignados a cada par de lecturas durante el proceso de secuenciación.

Con el fin de realizar la asignación taxonómica a cada una de las secuencias demultiplexadas, se utilizó DADA2 (Callahan et al., 2016), un paquete de código abierto de R (R Core Team, 2018); junto con el pipeline recomendado para el análisis de microbiomas (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). De esta manera, se filtraron las secuencias teniendo en cuenta un Phred score mayor a 30, posteriormente se fusionaron las lecturas filtradas de *forward* y *reverse* y se removieron las posibles quimeras que se presentaran en algunas secuencias. Es importante mencionar que la calidad de la secuenciación fue óptima a través de longitud completa de las lecturas. Finalmente se realizó la asignación taxonómica de estas secuencias usando la base de datos SILVA v132.16s (Callahan, 2018) para el caso del bacterioma. Mientras que para la asignación taxonómica de los eucariotas se utilizó la base de datos *Protist Ribosomal Reference database* (PR2), que cuenta con secuencias de: protistas, metazoos, embriofitas y hongos (Guillou et al., 2013).

Análisis estadísticos

Inicialmente, se realizaron análisis descriptivos de los cuatro grupos de pacientes para determinar las frecuencias de infección y coinfección de los microorganismos de estudio en términos de porcentaje. Adicionalmente, se determinó la frecuencia relativa de los subtipos identificados de *Blastocystis* dentro de las muestras positivas, así como los porcentajes de coexistencia de los subtipos. Con el fin de evaluar asociaciones estadísticamente significativas entre los subtipos de *Blastocystis* y la ICD, se realizó una prueba exacta de Fisher, teniendo en cuenta un p-valor < 0,05.

Para los análisis del bacterioma y eucarioma se calculó la abundancia relativa de las categorías taxonómicas, teniendo en cuenta el número de lecturas asignado a cada categoría. En el caso del bacterioma, las posibles diferencias en las abundancias relativas de los tres phyla más abundantes dentro de cada grupo fueron evaluadas mediante una prueba Mann-Whitney ($p < 0,05$), dado que los datos no tenían una distribución normal. Por otra parte, las posibles diferencias significativas en las abundancias relativas de las tres clases de eucariotas más abundantes dentro de cada grupo fueron evaluadas mediante una prueba Mann-Whitney ($p < 0,05$). Sin embargo, el grupo B+/CD-

presentó una distribución normal en los datos de la abundancia de esta jerarquía taxonómica, y por ello se empleó una prueba T para evaluar las diferencias significativas ($p < 0,05$).

Posteriormente, se calculó el índice de diversidad alfa de Shannon-Weaver para los cuatro grupos de estudio, teniendo en cuenta las abundancias relativas de las categorías taxonómicas. Es importante resaltar que para el bacterioma este índice fue calculado a partir las abundancias relativas de los phyla identificados, mientras que para el eucarioma se utilizaron las abundancias relativas de las clases identificadas. Estas jerarquías taxonómicas fueron usadas debido a que son en las que suelen realizarse mayor número de asignaciones, y porque si se encontraban diferencias en estas jerarquías sería posible encontrar diferencias en grupos más específicos (géneros). Teniendo en cuenta el índice de Shannon-Weaver, se evaluaron las posibles diferencias significativas en la diversidad alfa de los grupos de estudio. Para el caso del bacterioma la distribución de los datos no fue normal y, por lo tanto, se realizó una prueba Mann Whitney; mientras que para el eucarioma se realizó una prueba T, dado que la distribución de los datos fue normal. En el caso de ambas pruebas estadísticas se tuvo en cuenta un valor $p < 0,05$ y un intervalo de confianza del 95%.

Adicionalmente, en el caso del bacterioma se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (diversidad beta) teniendo en cuenta los phyla identificados, con el fin de observar si existían diferencias en la composición del bacterioma entre los grupos de estudio. Para el caso del eucarioma no se realizó un PCA dado que no se contaba con suficiente información para establecer comparaciones entre la composición de los grupos, y porque la abundancia de eucariotas en la microbiota intestinal es menor que la del bacterioma. Es por lo anterior que se evaluaron diferencias significativas en las abundancias relativas de algunos géneros de eucariotas, mediante una prueba Mann-Whitney ($p < 0,05$). Los análisis descriptivos, estadísticos y las figuras correspondientes fueron realizadas en R (vegan: Community Ecology Package; ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis).

RESULTADOS

Descripción de los grupos de estudio

La frecuencia de infección por *C. difficile* (ICD) dentro de las 154 muestras fue de 66,23% ($n=102$), mientras que la frecuencia de *Blastocystis* fue de 31,17% ($n=48$). El grupo con coinfección por ambos organismos (B+/CD+) representó el 20,78% ($n=32$) de la población total; mientras que el

grupo libre de infección por parte de los microorganismos de estudio (B-/CD-) representó el 28,57% (n=44). Por otra parte, el grupo B+/CD- representó menos del 10% de la población total (n=8), y el grupo B-/CD+ representó cerca del 50% de la población total (n=70) (Figura S1).

Frecuencias relativas de los subtipos de *Blastocystis*

Para las 48 muestras con presencia de *Blastocystis* se identificaron los subtipos: ST1, ST2, ST3 y ST5, siendo los ST1 y ST3 los más frecuentes dentro de las muestras (Figura 1A). Además, el ST5 se identificó como el tercer subtipo más frecuente dentro de las 48 muestras. Ahora bien, 26 muestras presentaron infecciones mixtas por los subtipos identificados de *Blastocystis*, donde hasta tres subtipos coexisten en una misma muestra (Figura 1B). Así mismo, se calcularon las frecuencias de coexistencia de los subtipos, de manera que las frecuencias de coexistencia más altas fueron para los ST1/ST3 y ST1/ST5 (Figura 1C).

Por otro lado, la prueba exacta de Fisher mostró que no existe asociación estadísticamente significativa entre la ICD y la presencia de un subtipo de *Blastocystis* ($p= 0,0962$). A pesar de no encontrar una asociación significativa entre las variables, se observó una frecuencia relativa más baja del ST (2,98% ; n=2) en los pacientes con ICD, mientras que en los pacientes sin ICD su frecuencia fue de 14,81% (n=4). Adicionalmente la frecuencia relativa del ST1 fue de 22,2% (n=6) en los pacientes sin ICD, mientras que en los pacientes con ICD su frecuencia fue de 38,8% (n=26) (Figura S2).

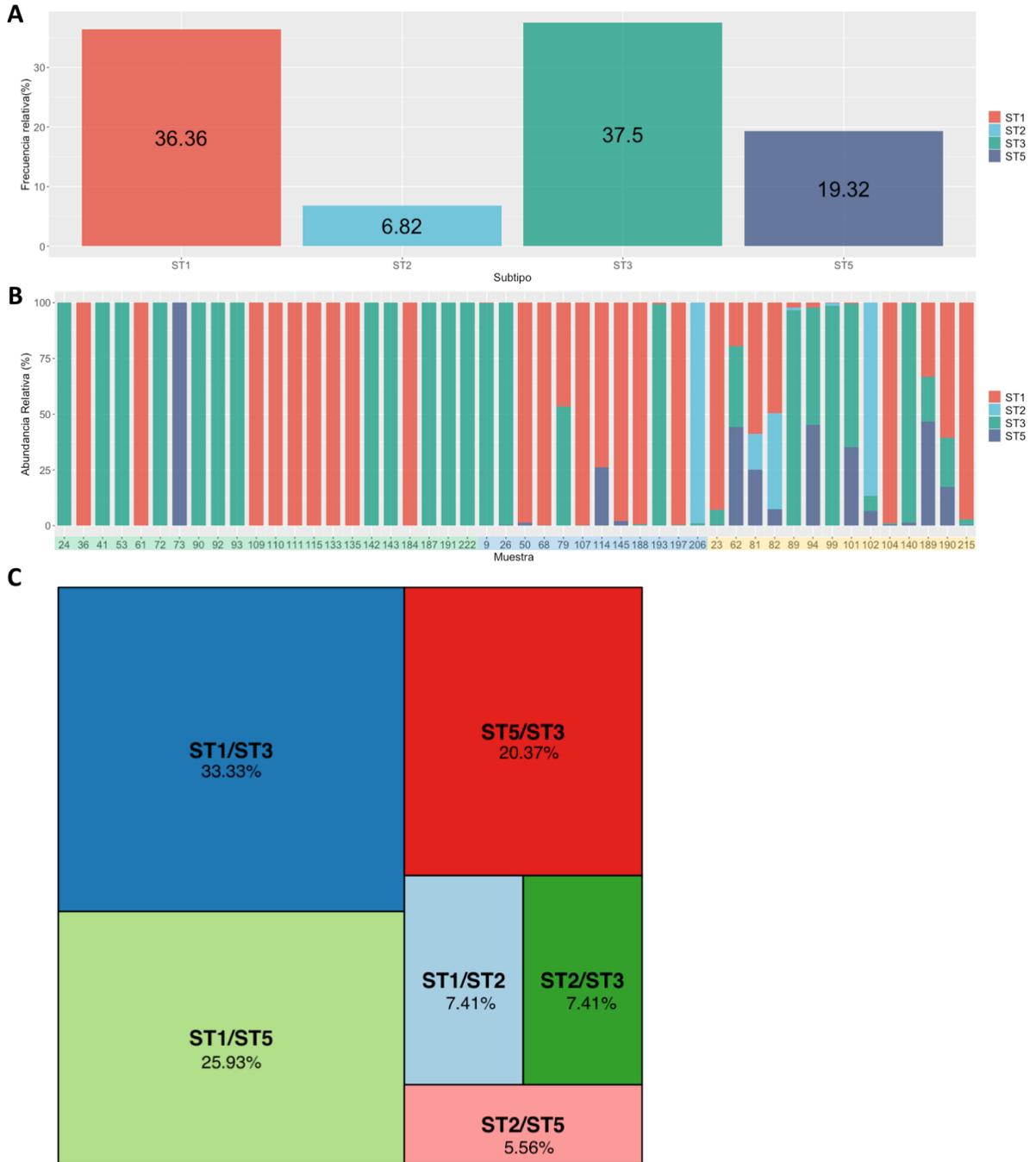


Figura 1. Descripción de los subtipos de *Blastocystis* dentro de 48 muestras fecales. **A.** Frecuencias relativas de los cuatro subtipos de *Blastocystis* identificados en las muestras. **B.** Abundancia relativa de los cuatro subtipos en cada una de las muestras, donde se puede evidenciar la coexistencia de estos en algunas muestras. En el eje x: las muestras resaltadas con verde indican la presencia de un solo subtipo, las muestras resaltadas con azul indican la

coexistencia de dos subtipos y las muestras resaltadas con amarillo indican la coexistencia de tres subtipos. C. Frecuencias relativas de la coexistencia de los subtipos dentro de las muestras. El tamaño de cada recuadro es proporcional al porcentaje obtenido para la coexistencia de los subtipos. Así, los recuadros grandes indican mayor frecuencia de coexistencia de algunos subtipos, y los recuadros pequeños indican una menor frecuencia de coexistencia de los subtipos identificados.

Descripción de la composición del bacterioma de los grupos de estudio

La secuenciación del fragmento del gen 16s-ARNr para las 154 muestras permitió obtener un total de 49 phyla, 270 familias y 661 géneros. Para facilitar la manipulación de los datos, los análisis fueron realizados con los phyla cuyas abundancias relativas fueran mayores al 1%. De esta manera se observó que los phyla más abundantes dentro de los cuatro grupos de estudio fueron: Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria. En el grupo con coinfección por los dos microorganismos (*Blastocystis* y *C. difficile*) se encontró una diferencia significativa entre las abundancias relativas de Firmicutes (45,3%), de Bacteroidetes (32,75%) y Proteobacteria (19,93%) ($p < 0,01$) (Figura S3). Para el caso del grupo libre de infección por los dos microorganismos, también se encontró una diferencia significativa entre las abundancias relativas de Firmicutes (42,9%), de Bacteroidetes (31,45%) y Proteobacteria (23,39%) ($p < 0,05$) (Figura S4). En el grupo B-/CD+ no se encontró una diferencia significativa, únicamente entre las abundancias de Bacteroidetes (30,63%) y Proteobacteria (27,34%) ($p > 0,05$). No obstante, para este grupo de estudio se encontraron diferencias significativas entre la abundancia de Firmicutes (30,63%) y Bacteroidetes; y entre la abundancia de Firmicutes y Proteobacteria ($p < 0,05$) (Figura S5). Finalmente, en el grupo B+/CD- no se encontró una diferencia significativa en las abundancias relativas de Firmicutes (40,11%), de Bacteroidetes (28,55%) y Proteobacteria (26,42%) ($p > 0,05$) (Figura S6).

El análisis de diversidad alfa entre los cuatro grupos indicó que el grupo libre de infección presenta una diversidad de phyla significativamente menor que la del grupo B+/CD- ($p = 0,026$). No se encontraron diferencias significativas de la diversidad de phyla entre los demás grupos de estudio (Figura 2). Por otro lado, el análisis de componentes principales (PCA) mostró que no hay cambios significativos en la composición de los phyla en los cuatro grupos de estudio (Figura 3).

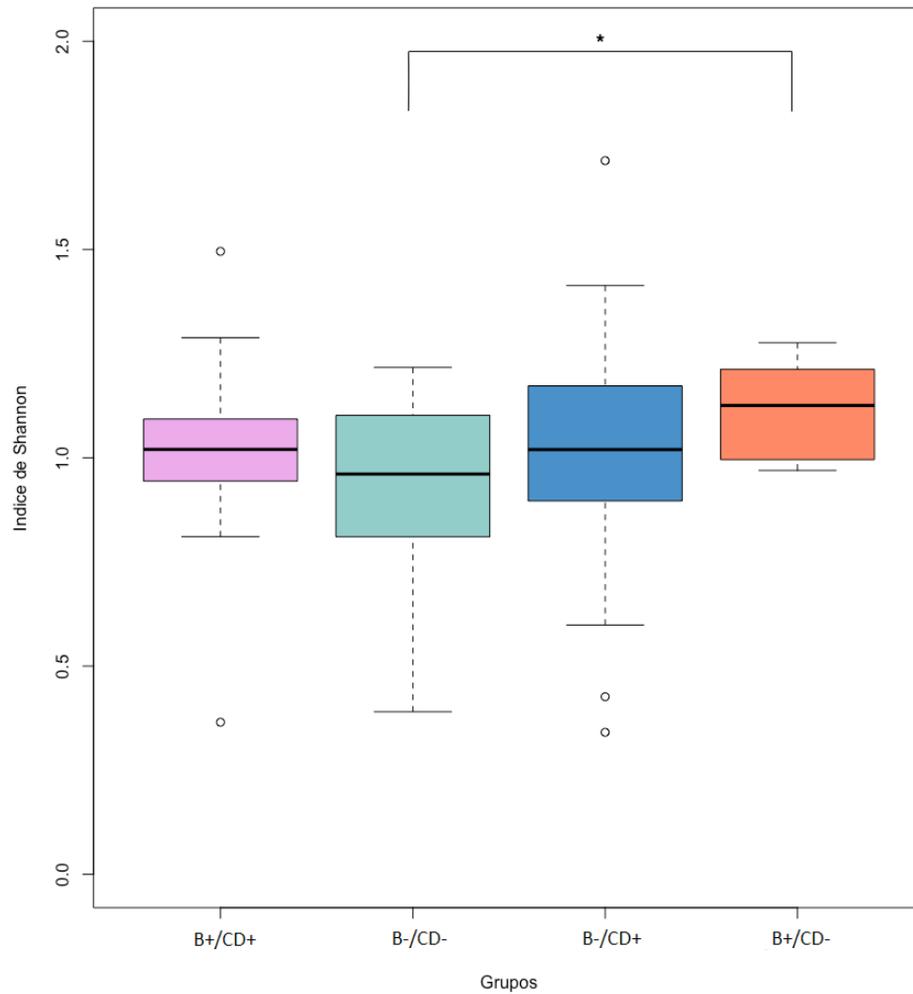


Figura 2. Análisis de la diversidad alfa mediante el índice Shannon-Weaver entre los cuatro grupos de estudio basado en las abundancias relativas de los phyla identificados. Las diferencias significativas entre los grupos fueron evaluadas por la prueba Mann-Whitney (*, p-valor<0,05).

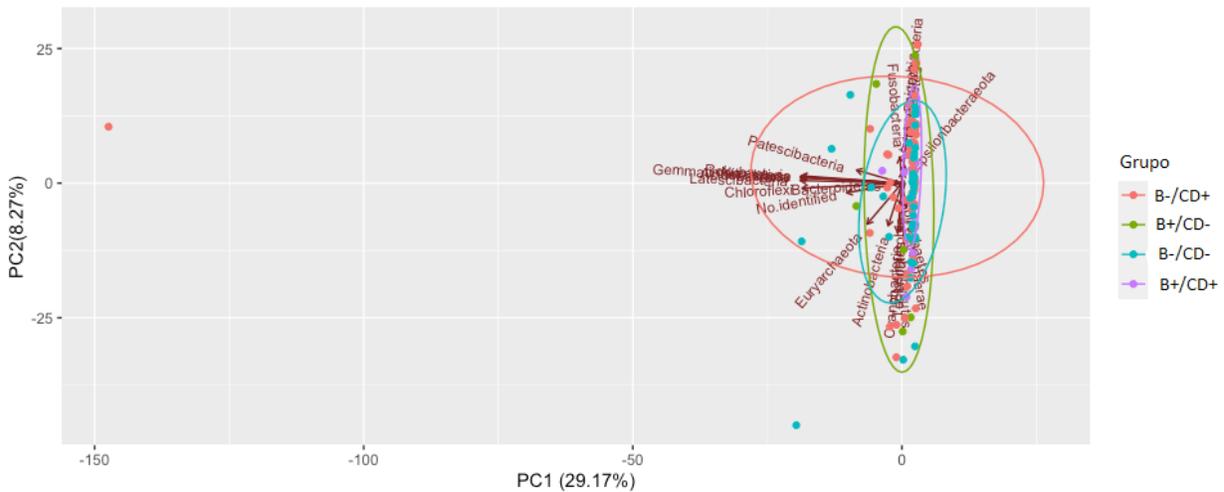


Figura 3. Análisis de componentes principales (diversidad beta) entre los cuatro grupos de estudio. Para la figura “B-/CD+” indica el grupo con infección por *C. difficile*, “B+/CD-” indica el grupo que sólo presenta colonización por *Blastocystis*, “B-/CD-” indica el grupo libre de los dos microorganismos de estudio y “B+/CD+” indica el grupo con coinfección por los dos microorganismos de estudio.

Al no encontrar diferencias significativas en la diversidad alfa entre algunos de los grupos, se tomaron los géneros de bacterias considerados como posibles biomarcadores del bacterioma (Gorvitovskaia et al., 2016; Oozeer et al., 2010) con el fin de evaluar posibles diferencias en su abundancia entre los cuatro grupos de análisis. La Figura S7 muestra la abundancia relativa de los 20 géneros seleccionados en cada uno de los grupos, donde sólo cinco de estos presentaron diferencias significativas en su abundancia. En cuanto a los géneros: *Faecalibacterium*, *Dorea*, miembros de las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae, respectivamente, se encontró que sus abundancias fueron significativamente mayores en el grupo con coinfección, que en los grupos: sin infección y B-/CD+ (Figura 4). Así mismo, en el caso de la familia Ruminococcaceae, se encontró que su abundancia fue significativamente mayor en el grupo B+/CD-, que en el grupo libre de infección y que en el grupo B-/CD+. Finalmente, en el caso de *Bilophila*, se encontró que su abundancia fue significativamente menor en el grupo libre de infección, que en los otros tres grupos de estudio (Figura 4).

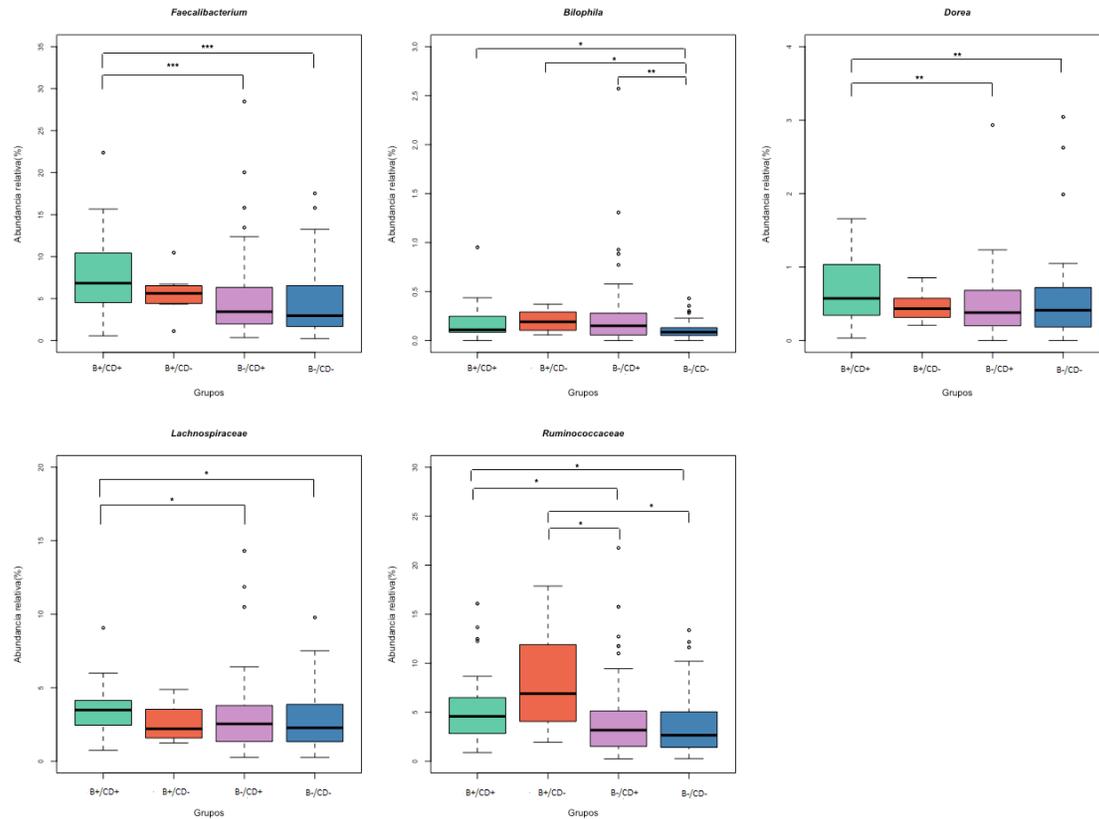


Figura 4. Abundancia relativa de cinco géneros considerados como posibles biomarcadores del bacterioma. Las diferencias significativas entre los grupos de estudio fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (*, p-valor < 0,05; **, p-valor < 0,01; ***, p-valor < 0,001).

Descripción de la composición del eucarioma de los grupos de estudio

La secuenciación del fragmento del gen 18S-ARNr permitió la identificación de diferentes grupos de hongos, protistas y otros eucariotas; así se obtuvieron 10 supergrupos, 123 clases, 397 familias y 858 géneros en total. Para los análisis del eucarioma se empleó la categoría taxonómica de clase, y se seleccionaron aquellas que tuvieran un porcentaje de abundancia relativa mayor al 3%. Adicionalmente, se removieron las lecturas de diferentes metazoos y embriofitas con el fin de enfocar el análisis en los grupos de hongos, protozoos y helmintos intestinales.

De esta manera, las tres clases de eucariotas más abundantes en los cuatro grupos fueron: Ascomycota (Fungi), Basidiomycota (Fungi) y Opalinata (Opalozoa). En el grupo con coinfección se obtuvo una abundancia de 35,42% de Opalinata, 34,43% de Ascomycota y 11,31% de Basidiomycota. No se encontraron diferencias significativas únicamente entre las abundancias

relativas de Ascomycota y Opalinata ($p > 0,05$; [Mann-Whitney]) (Figura S8). En el grupo libre de infección se obtuvo una abundancia del 49,56% de Ascomycota, 18,83% de Basidiomycota y 7,96% de Opalinata ($p < 0,01$; [Mann-Whitney]) (Figura S9). Para el grupo B-/CD+ se observó una abundancia de 52,55% de Ascomycota, 16,53% de Basidiomycota y 11,9% de Opalinata ($p < 0,05$; [Mann-Whitney]) (Figura S10). Finalmente, en el grupo B+/CD- se observó una abundancia de 30,9% de Opalinata, 28,22% de Ascomycota y 11,78% de Basidiomycota. Para este grupo sólo se encontraron diferencias significativas entre la abundancia relativa de Ascomycota y Basidiomycota ($p < 0,05$; [Prueba T]) (Figura S11).

Por otro lado, el análisis de diversidad alfa entre los cuatro grupos de estudio indicó que la diversidad de clases de eucariotas del grupo B+/CD- es significativamente mayor que la diversidad de las clases del grupo con coinfección. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de las clases de eucariotas entre los demás grupos de estudio (Figura 5). Es por lo anterior que se decidió evaluar posibles diferencias en la abundancia de grupos más específicos del eucarioma.

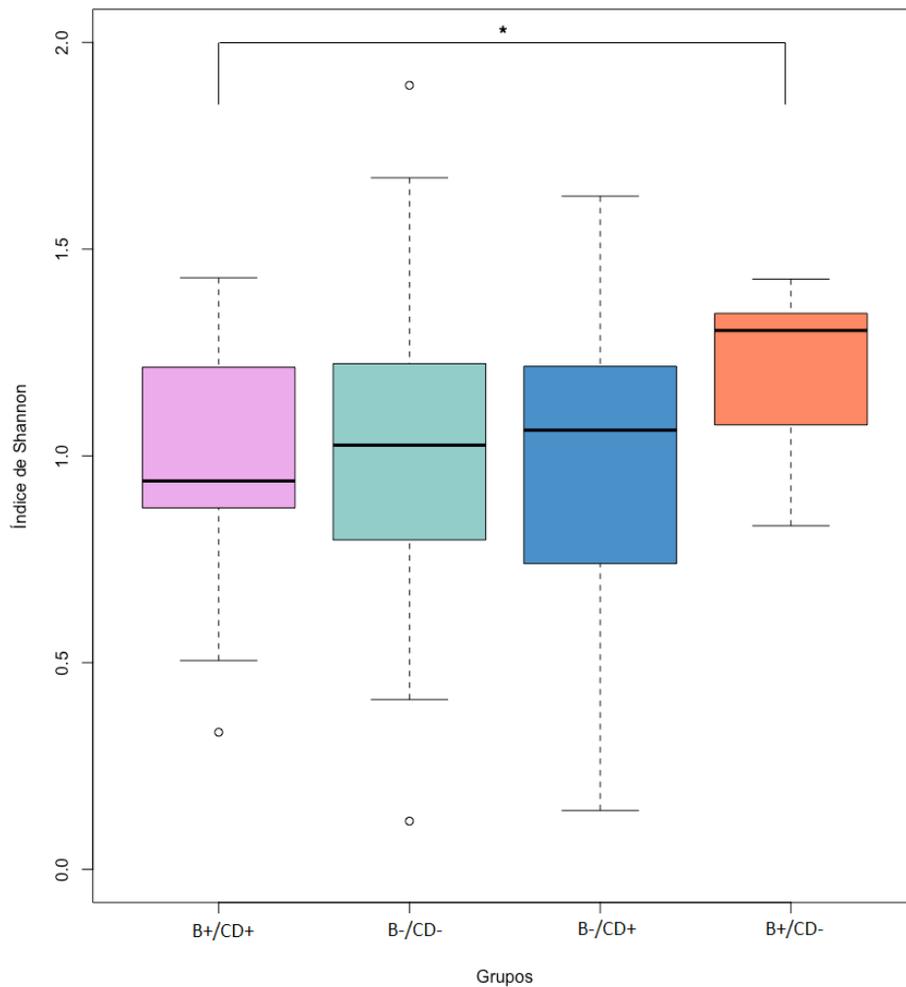


Figura 5. Análisis de diversidad alfa mediante el índice de Shannon entre los cuatro grupos de estudio basado en las abundancias relativas de las clases de eucariotas identificadas. Las diferencias significativas entre los grupos fueron evaluadas por una prueba T (*, p-valor<0,05).

Por lo tanto, se identificaron únicamente dos géneros considerados como *Common Luminal Intestinal Parasitic Protists* (CLIPPs): *Entamoeba* y *Endolimax* (Stensvold, 2019). Adicionalmente, se seleccionaron los tres géneros más abundantes de hongos (*Candida*, *Saccharomyces* y *Malassezia*) y el género más abundante de los nemátodos (*Strongyloides*). La Tabla 1 muestra el valor de la abundancia media de los seis géneros anteriormente mencionados, junto con su respectiva desviación estándar (DS).

Tabla 1. Abundancias relativas medias de los seis géneros de eucariotas seleccionados para los cuatro grupos de estudio

Género	Grupos			
	Coinfección (Media ± DS)	Libre de infección (Media ± DS)	B- / CD+ (Media ± DS)	B+ / CD- (Media ± DS)
<i>Candida</i>	15,93 ± 18,2	19,2 ± 19,02	24,26 ± 23,49	14,61 ± 7,14
<i>Saccharomyces</i> *	13,65 ± 14,6	20,19 ± 18,27	19,75 ± 17,65	9,14 ± 5,79
<i>Malassezia</i> *	10,55 ± 14,3	16,48 ± 17,13	15,25 ± 14,13	11,37 ± 12,71
<i>Entamoeba</i>	2,3 ± 12,1	0,07 ± 0,34	0,03 ± 0,08	0,27 ± 0,53
<i>Strongyloides</i>	1,46e-2 ± 0,07	0,84 ± 5,09	1,2e-2 ± 0,10	1,93e-2 ± 5,47e-2
<i>Endolimax</i>	1,48e-3 ± 8,2e-3	6,82e-5 ± 4,3e-4	1,3e-4 ± 1e-3	5,16e-3 ± 1,46e-2

* Géneros que presentaron diferencias significativas en sus abundancias, dentro de algunos de los grupos de estudio

Los resultados obtenidos por la prueba estadística arrojaron diferencias significativas únicamente para las abundancias de *Saccharomyces* y *Malassezia*, dentro de algunos grupos de estudio. En el caso del primero, se encontró que su abundancia fue significativamente menor en el grupo con coinfección que en los grupos: sin infección y B-/CD+ ($p < 0,05$). Por otro lado, se observó que la abundancia de *Malassezia* es significativamente menor en el grupo con coinfección que en el grupo B-/CD+ ($p < 0,05$). Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en las abundancias de estos géneros entre los demás grupos de estudio (Figura S12).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La “Hipótesis del Oxígeno” sugiere que los escenarios de disbiosis pueden impedir la colonización por parte de organismos anaerobios obligados, como *Blastocystis*. Como consecuencia de la baja concentración de butirato disponible para el metabolismo oxidativo de los colonocitos, las concentraciones de oxígeno luminal incrementan, al igual que la abundancia de bacterias patógenas. Así, este ambiente ocasionaría un estrés oxidativo sobre *Blastocystis*, y por lo tanto su supervivencia se vería afectada (Rigottier-Gois, 2013; Stensvold & van der Giezen, 2018). No

obstante, los resultados aquí expuestos muestran un porcentaje de 20,78% de coinfección por *Blastocystis* y *C. difficile* dentro de la población total (Figura S1), lo que sugiere una posible adaptación de *Blastocystis* al estrés oxidativo de la disbiosis generada por *C. difficile*. Esto podría ser posible gracias a su mecanismo de la oxidasa alternativa (OXA) (Tsaousis et al., 2018) y a las cinco familias de genes adquiridas por transferencia lateral de genes, involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en *Blastocystis* (Eme et al., 2017). Por lo tanto, esta hipótesis permitiría proponer a *Blastocystis* como un organismo más generalista, que podría colonizar un rango de ambientes más amplios que los descritos comúnmente.

Los resultados obtenidos para la subtipificación de *Blastocystis* concuerdan con lo reportado en otros estudios, donde se describe que los ST3 y ST1 son algunos de los subtipos más abundantes en el intestino humano (Figura 1) (Stensvold & Clark, 2016; Ramírez et al., 2017). Además, este resultado es coherente con la descripción de la distribución geográfica de estos subtipos en Colombia (Ramírez et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito que el ST3 es uno de los subtipos más susceptibles al estrés oxidativo (Tito et al., 2019; Balakrishnan & Kumar, 2014). No obstante, esto no se aplica a los resultados obtenidos dado que las frecuencias relativas de este subtipo fueron similares tanto para los pacientes que presentaban ICD, como para aquellos que no. En cambio, para el ST2 se obtuvo una frecuencia relativa mayor dentro de los pacientes que no presentaban ICD, lo que puede sugerir que este subtipo presenta sensibilidad al estrés oxidativo (Figura S2). Es por lo mencionado anteriormente, que la posible adaptación al estrés oxidativo de los escenarios de disbiosis también depende del subtipo de *Blastocystis*. Sin embargo, futuros estudios funcionales deben estar encaminados a resolver esta premisa.

Por otro lado, el hallazgo del ST5 como el tercer subtipo más abundante dentro de las muestras es interesante, dado que en Colombia no se había reportado la presencia de este subtipo (Figura 1) (Ramírez et al., 2014; Ramírez et al., 2016). De hecho, la detección de este subtipo no es común en humanos, aunque se han reportado bajas frecuencias de ST5 en Bolivia, Pakistán, Tailandia y el Reino Unido (Ramírez et al., 2016; Yakoob et al., 2010; Pintong et al., 2018; Alfellani et al., 2013). Adicionalmente, este subtipo se ha detectado principalmente en: primates no humanos, avestruces, perros, ratas y algunos mamíferos ungulados, y por lo tanto se le ha atribuido un perfil zoonótico (Zhu et al., 2017; Cian et al., 2017). Para el presente estudio es importante tener cuenta que la detección de estos subtipos se realizó con un método de secuenciación de alta resolución y sensibilidad. Además, es posible pensar que este subtipo cuenta con varios recursos disponibles en

el escenario de disbiosis, lo que facilitaría su colonización en el intestino de los pacientes. Como se mencionará más adelante, se ha propuesto un posible rol predatorio para *Blastocystis*, que genera una disminución en la competencia entre las comunidades bacterianas (Laforest-Lapointe & Arrieta 2018). De esta manera, el ST5 puede estar sobreviviendo en este escenario de disbiosis al alimentarse de diferentes grupos de bacterias, al tiempo que ayuda a disminuir la competencia entre otras comunidades bacterianas de la microbiota.

El presente estudio ofrece una primera descripción de la composición del bacterioma y eucarioma en un caso de coinfección por *Blastocystis* y *C. difficile*. Esto con el fin de obtener un panorama más amplio sobre este escenario, así como de poder comparar los otros tres grupos de estudio. A pesar de que los resultados del PCA no mostraron una agrupación que permitiera diferenciar la composición del bacterioma de cada grupo de estudio (Figura 3), se encontró que la mayoría de los géneros biomarcadores evaluados son más abundantes dentro de los dos grupos con *Blastocystis* (Figura 4). En el caso de *Faecalibacterium* (Ruminococcaceae) y *Dorea* (Lachnospiraceae), sus abundancias resultaron mayores dentro del grupo de coinfección que en el grupo B-/CD+. La baja abundancia de estos géneros en el grupo B-/CD+ se ajusta a lo descrito por Antharam et al. (2013), donde se identifica una reducción de algunos géneros benéficos y productores de butirato pertenecientes a estas dos familias (*Dorea*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, etc.) a causa de la disbiosis generada por *C. difficile*.

Algunos estudios han indicado que la colonización por *Blastocystis* se asocia con una alta diversidad de comunidades bacterianas en el microbioma. Por ejemplo, el estudio desarrollado por Kodio et al. (2019) muestra que las familias: Clostrideaceae y Lachnospiraceae, y el género *Faecalibacterium* son más abundantes en niños con presencia de *Blastocystis*. Lo anterior, se ajusta a los resultados del presente estudio, dado que las abundancias relativas de Lachnospiraceae y *Faecalibacterium* fueron significativamente mayores en el grupo con coinfección que en los grupos libres de *Blastocystis*.

Es importante resaltar que Ruminococcaceae fue la unidad taxonómica con una abundancia significativamente mayor dentro de los dos grupos con *Blastocystis*, a comparación de los demás grupos de estudio. De la misma manera, la diferencia de la diversidad alfa entre el grupo libre de infección y el grupo B+/CD- está influenciada principalmente por la alta abundancia de Ruminococcaceae dentro de este último (Figura 2). Estos resultados se ajustan a lo descrito por

Audebert et al. (2016), donde se encontró mayor abundancia de Ruminococcaceae dentro de personas colonizadas por *Blastocystis*, mientras que las personas libres de *Blastocystis* tenían un enriquecimiento de Enterobacteriaceae y Enterococcaceae. Además, el estudio de Tito et al. (2019) muestra que existe una mayor proporción de personas con colonización por *Blastocystis*, especialmente del ST4, que tienen el enterotipo Ruminococcaceae. Dado lo anterior, es importante que en futuros estudios se evalué la posible asociación entre los subtipos descritos de *Blastocystis* y Ruminococcaceae.

La alta diversidad de estos géneros (*Faecalibacterium* y *Dorea*) y familias de bacterias (Lachnospiraceae y Ruminococcaceae) puede explicarse por el posible rol predatorio de *Blastocystis*. Esta hipótesis sugiere que *Blastocystis* puede reducir la competencia por nutrientes y espacio al preda algunos grupos de bacterias, lo que resulta en un incremento en la riqueza de otros grupos bacterianos (Laforest-Lapointe & Arrieta 2018). Así, los resultados de las abundancias de estos géneros de bacterias de las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, en el grupo B+/CD- apoyan la hipótesis del rol benéfico que puede tener *Blastocystis* sobre los miembros de la microbiota. Lo anterior se puede inferir debido a que en este grupo no existe el factor de estrés que representa la ICD, por lo que *Blastocystis* puede usar diversos recursos para su colonización, y así conducir a un aumento en las abundancias de géneros benéficos como los de la familia Ruminococcaceae.

Por otra parte, el patobionte *Bilophila* se ha encontrado con una abundancia mayor cuando existen alteraciones en el metabolismo de ácidos biliares (David et al., 2014; Molinero et al., 2019). Así, la baja abundancia de este género dentro del grupo libre de infección podría explicarse precisamente por el hecho de que no presenta colonización/infección por los organismos de estudio. De esta manera, es posible que los pacientes de este grupo no presenten una alteración en el metabolismo de ácidos biliares, y por lo tanto la abundancia de *Bilophila* es menor comparada con los grupos que presentan disrupción de la microbiota. A pesar de que en este estudio no se tenía información sobre el tipo de dieta de los pacientes, es importante considerar este factor debido a que puede influenciar el metabolismo de ácidos biliares (David et al., 2014).

Para el caso de algunos géneros que se han visto asociados a *Blastocystis* (ej. *Prevotella* y *Akkermansia*) (Andersen et al., 2016; Tito et al., 2019) no se encontraron diferencias significativas en sus abundancias, y por lo tanto no fueron incluidos en los resultados aquí reportados. Si bien,

en el presente estudio se contaba con un grupo libre de colonización/infección por los microorganismos de estudio, estos pacientes también presentaban diarrea por alguna alteración fisiológica. Es por esto, que en el presente estudio se contempla la limitación de no contar con una población que presentara una microbiota sin alteraciones para evaluar el rol de *Blastocystis*, o incluso con una población que presentara una microbiota sin alteraciones fisiológicas y sin colonización por *Blastocystis*. Lo anterior puede ser una premisa de estudio a la que futuras investigaciones deben encaminarse, con el fin de obtener un panorama más amplio sobre los posibles cambios de la microbiota bajo diferentes estados de salud.

Los resultados expuestos anteriormente no se ajustan a lo descrito en otros artículos donde se menciona que *Blastocystis* puede disminuir la abundancia de géneros con propiedades antiinflamatorias en pacientes con síndrome de colon irritable (Nagel et al., 2016; Nourrisson et al., 2014). De la misma manera, Yason et al. (2019) reportó que la presencia del ST7 disminuye las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mientras aumenta las poblaciones de *Escherichia coli*. No obstante, este estudio muestra una aproximación *in vivo* que puede quedarse corta si se compara con la escala ecológica del microbioma intestinal, de manera que pueden omitirse muchas relaciones entre diversos grupos de microorganismos. Además, al ST7 se le han atribuido propiedades patogénicas que no han sido observadas en otros subtipos, como los que se encontraron en este estudio.

En el caso de la descripción del eucarioma, la identificación de las clases de Ascomycota y Basidiomycota como las más abundantes dentro de los grupos de estudio se ajusta a lo reportado por Nash et al. (2017). Además, en este estudio también se identifica a *Candida*, *Malassezia* y *Saccharomyces* como los géneros más abundantes y como posibles grupos *core* del micobioma (Nash et al., 2017). Sin embargo, sus funciones dentro de la microbiota intestinal aún se desconocen. A pesar de que los pacientes pertenecientes a los cuatro grupos no muestran un perfil sano en su microbiota, sólo fue posible identificar dos CLIPPs y un nemátodo en bajas abundancias (Tabla 1). Sin embargo, la presencia de *Endolimax nana* es soportada por el hecho de que este parásito suele co-colonizar con *Blastocystis* (Stensvold, 2019). El hallazgo de pocos CLIPPs en las muestras puede estar explicado porque microorganismos como: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba*, entre otros; no presentan hidrogenosomas que les permitan sobrevivir al ambiente aeróbico de la disbiosis (Tachezy, 2019; Stechmann et al., 2008). Es necesario que futuros estudios evalúen el efecto de estos tres géneros de parásitos sobre las comunidades bacterianas de los cuatro

grupos, con el fin de obtener una visión más amplia sobre la interacción entre estas unidades taxonómicas dentro del microbioma.

Por otro lado, las diferencias significativas encontradas en las abundancias de *Saccharomyces* y *Malassezia* (Figura S11) no apoyan lo reportado por Nieves-Ramírez et al. (2018). Dado que este artículo menciona que la presencia de *Blastocystis* puede generar un aumento en la abundancia de las levaduras y en otros géneros de hongos (Nieves-Ramírez et al., 2018). Ahora bien, se ha reportado que la ICD no altera las abundancias medias de los hongos de la microbiota (Skraban et al. 2013). Lo anterior permitiría explicar por qué no existen diferencias significativas en la abundancia de *Saccharomyces* y *Candida* entre los grupos que presentan ICD y los que no presentan ICD.

En un escenario de disbiosis es posible que las levaduras incrementen su tamaño poblacional, debido a la alta concentración de oxígeno y la baja concentración de algunos carbohidratos (Pfeiffer & Morley, 2014). Sin embargo, las bajas abundancias obtenidas para *Saccharomyces* y *Malassezia* dentro del grupo con coinfección, permitirían hipotetizar que bajo este escenario *Blastocystis* y los géneros de hongos evaluados compiten por recursos para su metabolismo (Eme et al., 2017; Tachezy, 2019). Esta hipótesis debe ser abordada en futuros estudios para su confirmación. En vista de que la mayoría de los estudios de la microbiota se enfocan en el bacterioma, la información que se tiene sobre el efecto de la disbiosis o la presencia de *Blastocystis* sobre comunidades de hongos y otros eucariotas es limitada (Hooks & O'Malley, 2019). Así, los resultados expuestos pueden contribuir a llenar este vacío de conocimiento sobre la descripción del eucarioma, cuando existen disrupciones de la microbiota intestinal.

El presente estudio reporta por primera vez la frecuencia de coinfección por parte de *Blastocystis* y *C. difficile*, así como la presencia del ST5 en pacientes colombianos. La presencia de este subtipo en los pacientes puede explicarse por la disponibilidad de recursos con la que podría contar *Blastocystis* en el ambiente de disbiosis, y que le permitirían sobrevivir aún bajo este factor de estrés. Además, los resultados expuestos apoyan la hipótesis del rol predatorio de *Blastocystis*, ya que se observó que la abundancia de ciertos grupos bacterianos benéficos aumenta en los grupos con colonización por este eucariota. De esta manera, los resultados de este estudio respaldan la hipótesis que propone a *Blastocystis* como un protista comensal del microbioma que podría favorecer la proliferación bacterias potencialmente benéficas, y por tanto tener un efecto positivo

sobre el hospedero. Por otro lado, *Blastocystis* podría estar compitiendo con otros grupos de eucariotas a fin de encontrar los recursos suficientes para su supervivencia en un escenario de disbiosis. Algunas limitaciones del estudio fueron la ausencia de una *metadata* sobre los pacientes que permita tener en cuenta factores que influyen en la composición de la microbiota. Así mismo, los cuatro grupos de estudio no están balanceados, y no se tiene un grupo que funciones como control sano para realizar una comparación.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación- COLCIENCIAS (Proyecto número: 212477758147). Agradecemos a Mónica Santin por los servicios prestados para el protocolo de subtipificación de *Blastocystis*. Adicionalmente, agradecemos al Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario (GIMUR) por ofrecer las instalaciones y acompañamiento necesarios para el desarrollo del presente proyecto.

REFERENCIAS

Abt, M. C., McKenney, P. T., Pamer, E. G. 2016. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. Nature Reviews Microbiology, 14(10), 609.

Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S. U., Fagbenro-Beyioku, A. F., Clark, C. G. 2013. Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. Acta tropica, 126(1), 11-18.

Andersen, L. B., Karim, A. B., Roager, H. M., Vignsnaes, L. K., Kroghfelt, K. A., Licht, T. R., Stensvold, C. R. 2016. Associations between common intestinal parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 35(9), 1427-1431.

Antharam, V. C., Li, E. C., Ishmael, A., Sharma, A., Mai, V., Rand, K. H., Wang, G. P. 2013. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in Clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea. Journal of clinical microbiology, 51(9), 2884-2892.

Audebert, C., Even, G., Cian, A., et al. 2016. Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Scientific reports, 6, 25255.

- Balakrishnan, D. D., Kumar, S. G. 2014. Higher Caspase-like activity in symptomatic isolates of *Blastocystis* spp. *Parasites & vectors*, 7(1), 219.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, et al. 2018. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science (No. e27295v1). *PeerJ Preprints*.
- Callahan, B. 2018. Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 132) [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1172783>.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.
- Cani, P. D. 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716-1725.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., et al. 2017. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One*, 12(1), e0169659.
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L.C., et al. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 31, 431–455. doi: 10.1086/651706.
- Chudnovskiy, A., Mortha, A., Kana, V., et al. 2016. Host-protozoan interactions protect from mucosal infections through activation of the inflammasome. *Cell*, 167(2), 444-456.
- Cheung, M. K., Au, C. H., Chu, K. H., Kwan, H. S., Wong, C. K. 2010. Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing. *The ISME journal*, 4(8), 1053.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559.
- Eme, L., Gentekaki, E., Curtis, B., et al. 2017. Lateral gene transfer in the adaptation of the anaerobic parasite *Blastocystis* to the gut. *Current Biology*, 27(6), 807-820.
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., Huse, S. M. 2016. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, 4(1), 15.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., et al. (2013). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D597–D604. doi:10.1093/nar/gks1160160.

Hooks, K. B., O'Malley, M. A. 2019. Contrasting Strategies: Human Eukaryotic Versus Bacterial Microbiome Research. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.

Jiménez, P. A., Jaimes, J. E., Ramírez, J. D. 2019. A summary of Blastocystis subtypes in North and South America. *Parasites & vectors*, 12(1), 376.

Kodio, A., Coulibaly, D., Koné, A. et al. 2019. Blastocystis Colonization Is Associated with Increased Diversity and Altered Gut Bacterial Communities in Healthy Malian Children. *Microorganisms*, 7(12), 649.

Laforest-Lapointe, I., Arrieta, M. C. 2018. Microbial eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies. *MSystems*, 3(2), e00201-17.

Liang, D., Leung, R. K. K., Guan, W., Au, W. W. 2018. Involvement of gut microbiome in human health and disease: brief overview, knowledge gaps and research opportunities. *Gut pathogens*, 10(1), 3.

Lynch, S. V., Pedersen, O. 2016. The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369-2379.

Maloney, J. G., Molokin, A., Santin, M. 2019. Next generation amplicon sequencing improves detection of Blastocystis mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 119-125.

Marchesi, J. R., Ravel, J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal.

Milani, C., Ticinesi, A., Gerritsen, J., Nouvenne, A., et al. (2016). Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. *Scientific reports*, 6, 25945.

Molinero, N., Ruiz, L., Sanchez, B., et al. 2019. Intestinal bacteria interplay with bile and cholesterol metabolism: implications on host physiology. *Frontiers in physiology*, 10, 185.

Mullany, P., Allan, E., Roberts, A. P. 2015. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Research in microbiology*, 166(4), 361-367.

- Muñoz, M., Ríos-Chaparro, D. I., Herrera et al. 2018. New Insights into *Clostridium difficile* (CD) Infection in Latin America: Novel Description of Toxigenic Profiles of Diarrhea-Associated to CD in Bogotá, Colombia. *Frontiers in microbiology*, 9, 74.
- Nagel, R., Traub, R.J., Allcock, R.J.N., Kwan, M.M.S., Bielefeldt-Ohmann, H. 2016. Comparison of faecal microbiota in Blastocystis-positive and Blastocystis-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome* 4(1):47. doi:[10.1186/s40168-016-0191-0](https://doi.org/10.1186/s40168-016-0191-0).
- Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C. et al. 2017. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153. doi:10.1186/s40168-017-0373-4.
- Nieves-Ramírez, M. E., Partida-Rodríguez, O., Jin, M. et al. 2018. Asymptomatic intestinal colonization with protist Blastocystis is strongly associated with distinct microbiome ecological patterns. *mSystems*, 3(3), e00007-18.
- Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., et al. 2014. Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One* 9(11), e111868.
- Oozeer, R., Rescigno, M., Ross, R. P., Knol, J., Blaut, M., Khlebnikov, A., Doré, J. 2010. Gut health: predictive biomarkers for preventive medicine and development of functional foods. *British journal of nutrition*, 103(10), 1539-1544.
- Parfrey, L. W., Walters, W. A., Lauber, C. L., et al. 2014. Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in microbiology*, 5, 298.
- Pfeiffer, T., Morley, A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 17.
- Pintong, A. R., Sunyanusin, S., Prasertbun, R., et al. 2018. Blastocystis subtype 5: Predominant subtype on pig farms, Thailand. *Parasitology international*, 67(6), 824-828.
- Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C., Giraldo, J. C. 2017. Blastocystis subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PloS one*, 12(2), e0172586.

- Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., Stensvold, C. R. 2014. Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 223-228.
- Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, et al. 2016. Geographic distribution of human Blastocystis subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 32-35.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rigottier-Gois, L. 2013. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME journal*, 7(7), 1256.
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R. 2013. Blastocystis: getting to grips with our guileful guest. *Trends in parasitology*, 29(11), 523-529.
- Shahi, S. K., Freedman, S. N., Mangalam, A. K. 2017. Gut microbiome in multiple sclerosis: the players involved and the roles they play. *Gut microbes*, 8(6), 607-615.
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y., Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, 31(1), 69.
- Skraban, J., Dzeroski, S., Zenko, B., Mongus, D., Gangl, S., Rupnik, M. 2013. Gut microbiota patterns associated with colonization of different *Clostridium difficile* ribotypes. *PloS one*, 8(2), e58005.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., et al. 2008. Organelles in Blastocystis that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current biology*, 18(8), 580-585.
- Stensvold, C. R. 2019. Pinning down the role of common luminal intestinal parasitic protists in human health and disease—status and challenges. *Parasitology*, 146(6), 695-701.
- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O. B., Nielsen, H. V. 2012. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for

sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of clinical microbiology*, 50(6), 1847-1851.

Stensvold, C. R., Clark, C. G. 2016. Current status of *Blastocystis*: a personal view. *Parasitology international*, 65(6), 763-771.

Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S., Thompson, R. A., et al. 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends in parasitology*, 23(3), 93-96.

Stensvold, C. R., van der Giezen, M. 2018. Associations between gut microbiota and common luminal intestinal parasites. *Trends in parasitology*, 34(5), 369-377.

Tachezy, J. 2019. *Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes* (Vol. 9). Springer.

Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., et al. 2019. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68(7), 1180-1189.

Tsaousis, A. D., Hamblin, K. A., Elliott, et al. 2018. The human gut colonizer *Blastocystis* respire using Complex II and alternative oxidase to buffer transient oxygen fluctuations in the gut. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 371.

Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M. A., et al. 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology research*, 106(5), 1033-1038.

Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., Tan, K. S. W. 2019. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. *Microbiome*, 7(1), 30.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and bioengineering*, 89(6), 670-679.

Zhu, W., Tao, W., Gong, B., et al. 2017. First report of *Blastocystis* infections in cattle in China. *Veterinary parasitology*, 246, 38-42.

ANEXOS

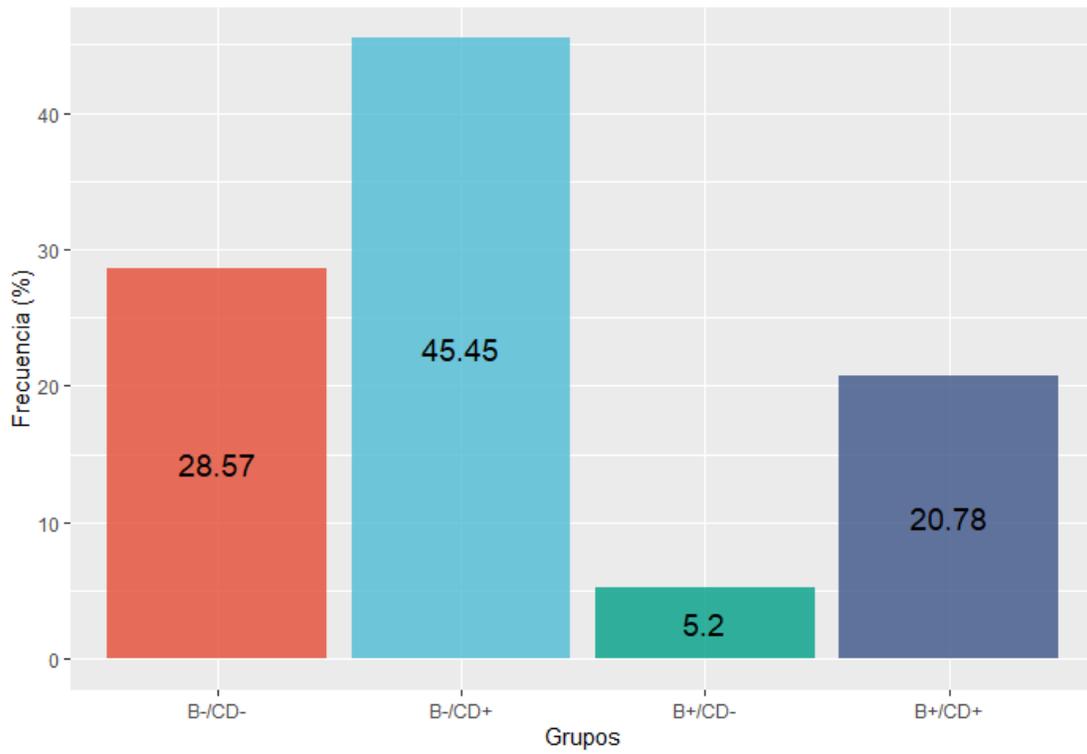


Figura S1. Frecuencias de los cuatro grupos de estudio que componen la población total (n=154).

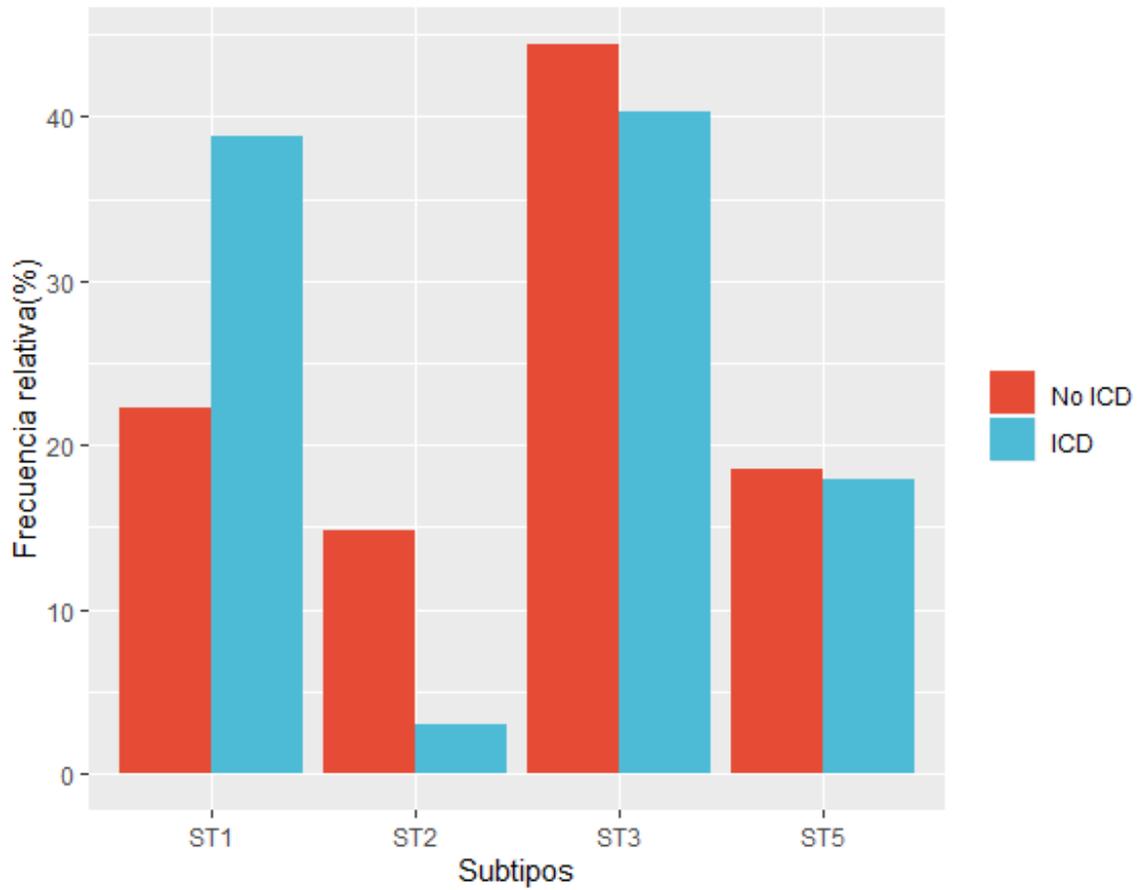


Figura S2. Frecuencia relativa de los cuatro subtipos de *Blastocystis* identificados en los pacientes con ICD y sin ICD.

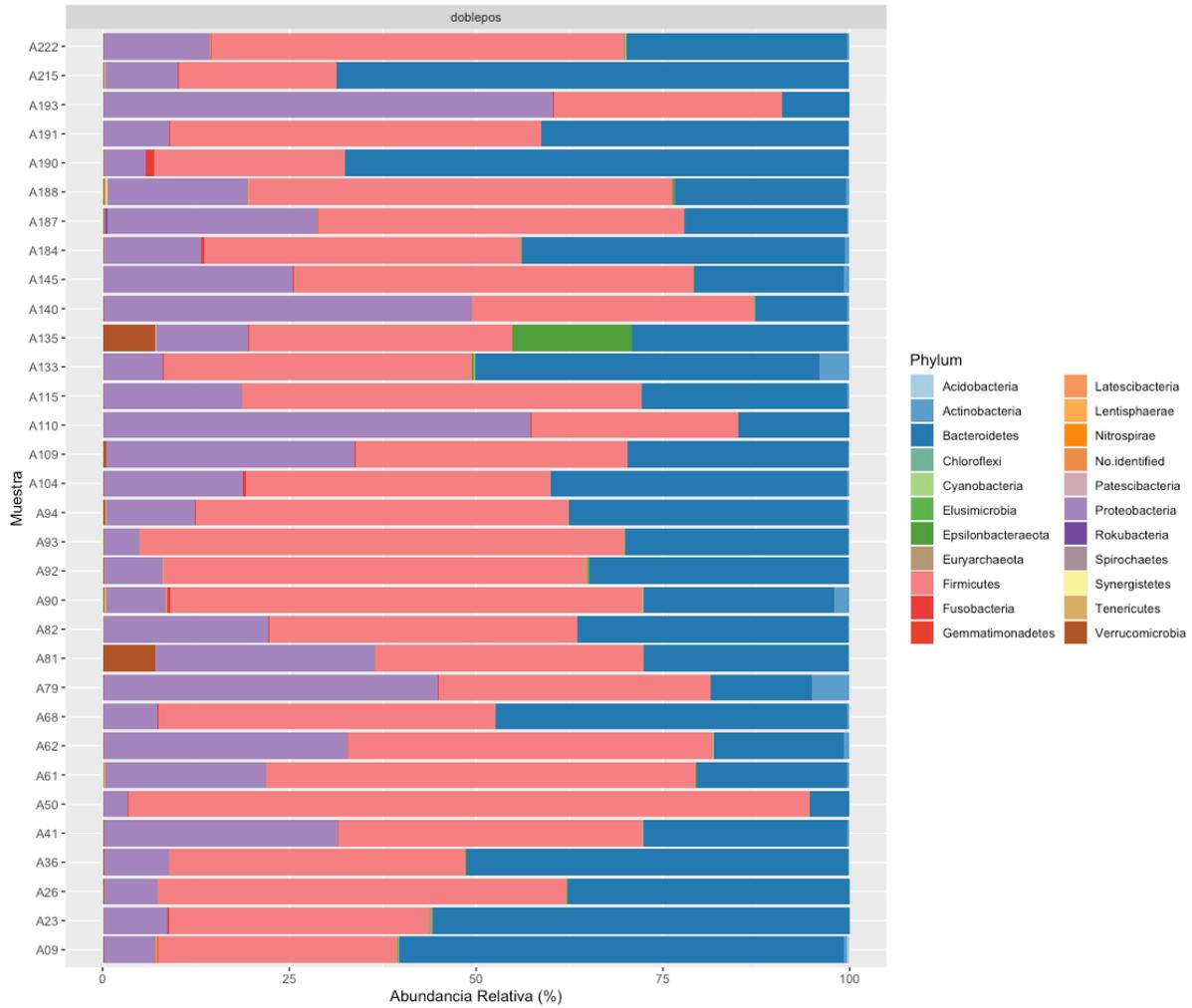


Figura S3. Abundancia relativa de los phyla de bacterias identificados en cada una de las muestras del grupo con coinfección por los organismos de estudio (B+/CD+).

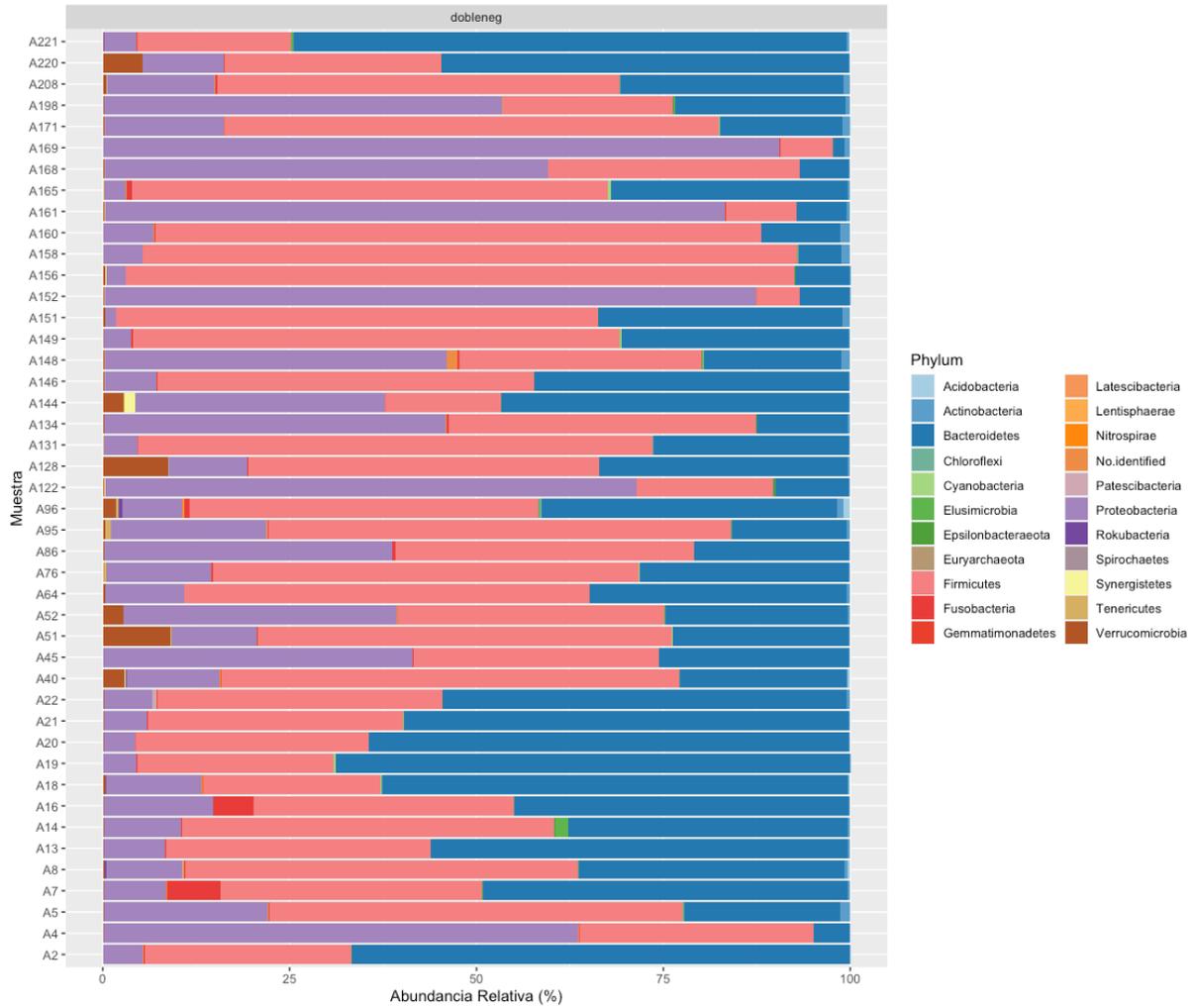


Figura S4. Abundancia relativa de los phyla de bacterias identificados en cada una de las muestras del grupo libre de infección por los organismos de estudio (B-/CD-).

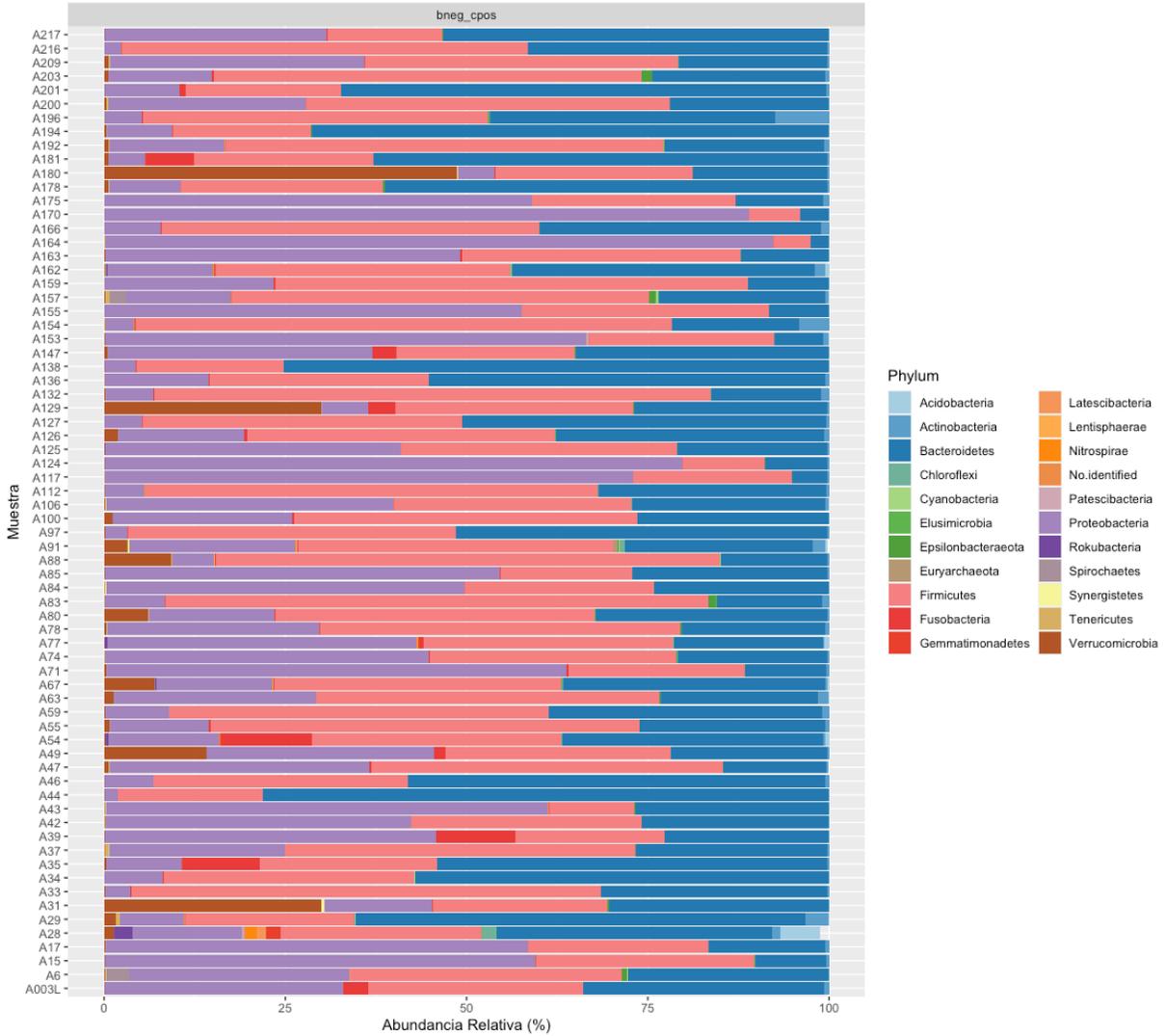


Figura S5. Abundancia relativa de los phyla de bacterias identificados en cada una de las muestras del grupo que presenta únicamente ICD (B-/CD+).

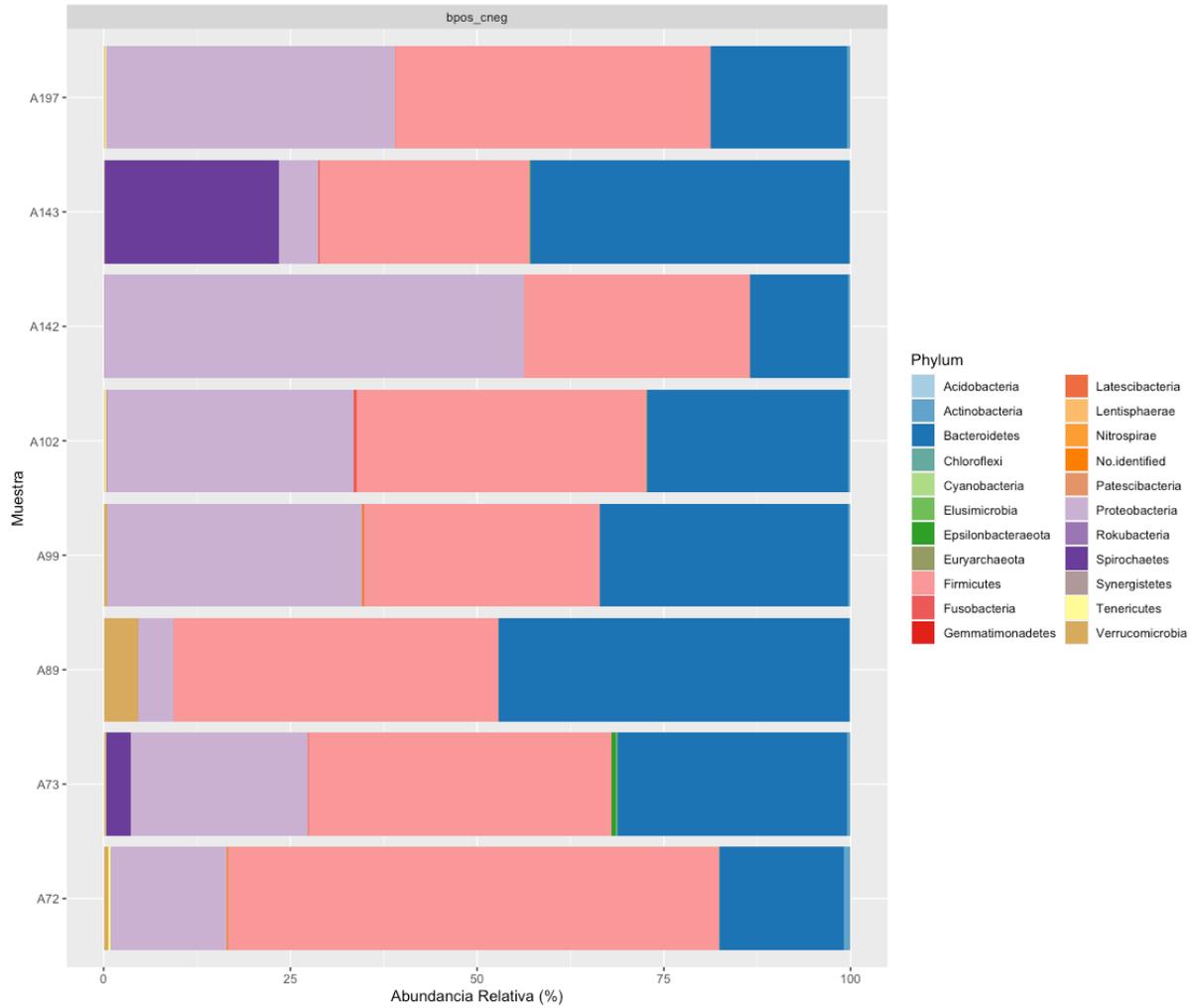


Figura S6. Abundancia relativa de los phyla de bacterias identificados en cada una de las muestras del grupo que presenta únicamente colonización por *Blastocystis* (B+/CD-)

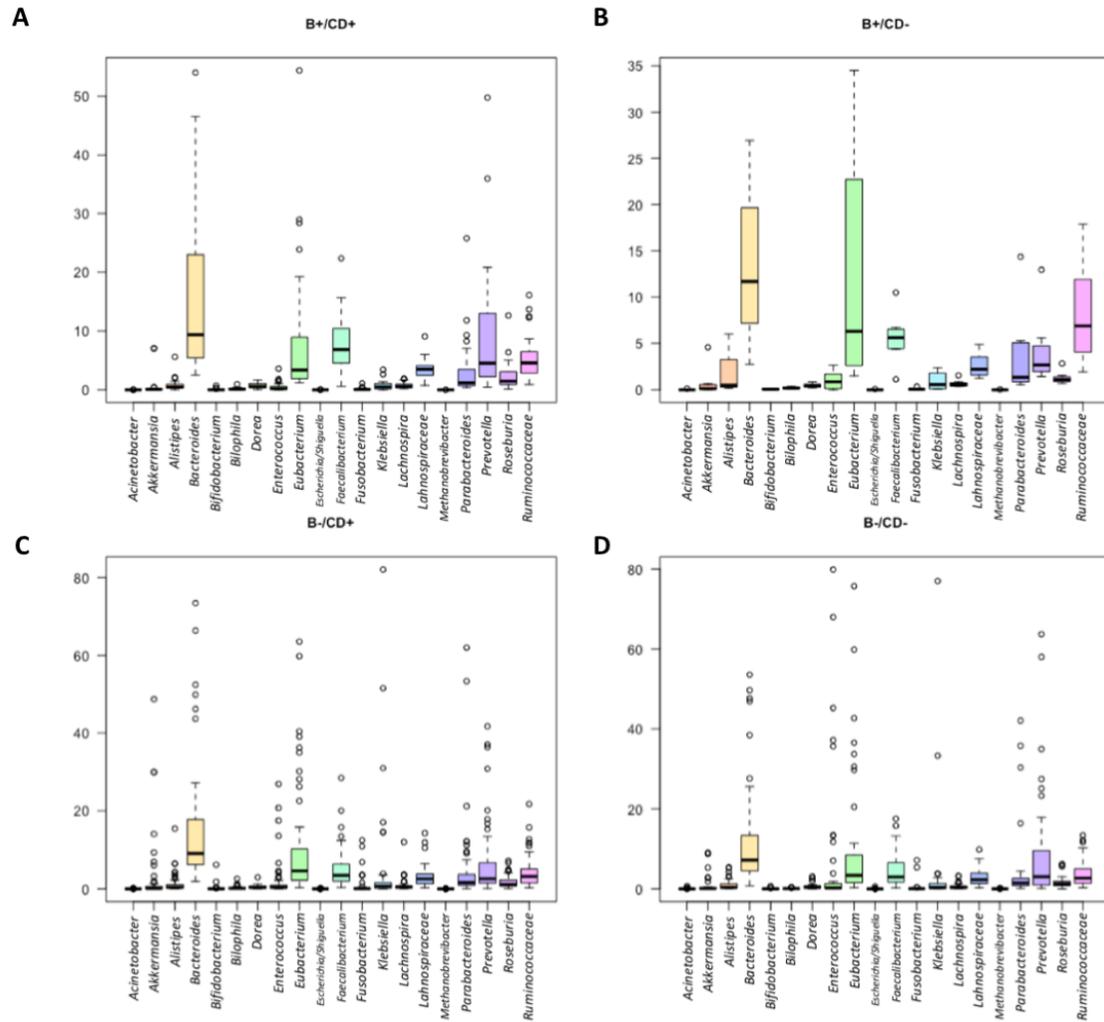


Figura S7. Abundancias relativas de los 20 géneros seleccionados por su posible rol de biomarcadores en el bacterioma, teniendo en cuenta: **A.** el grupo con coinfección, **B.** el grupo que presenta únicamente ICD **C.** el grupo que presenta únicamente colonización por *Blastocystis* y **D.** el grupo libre de infección.

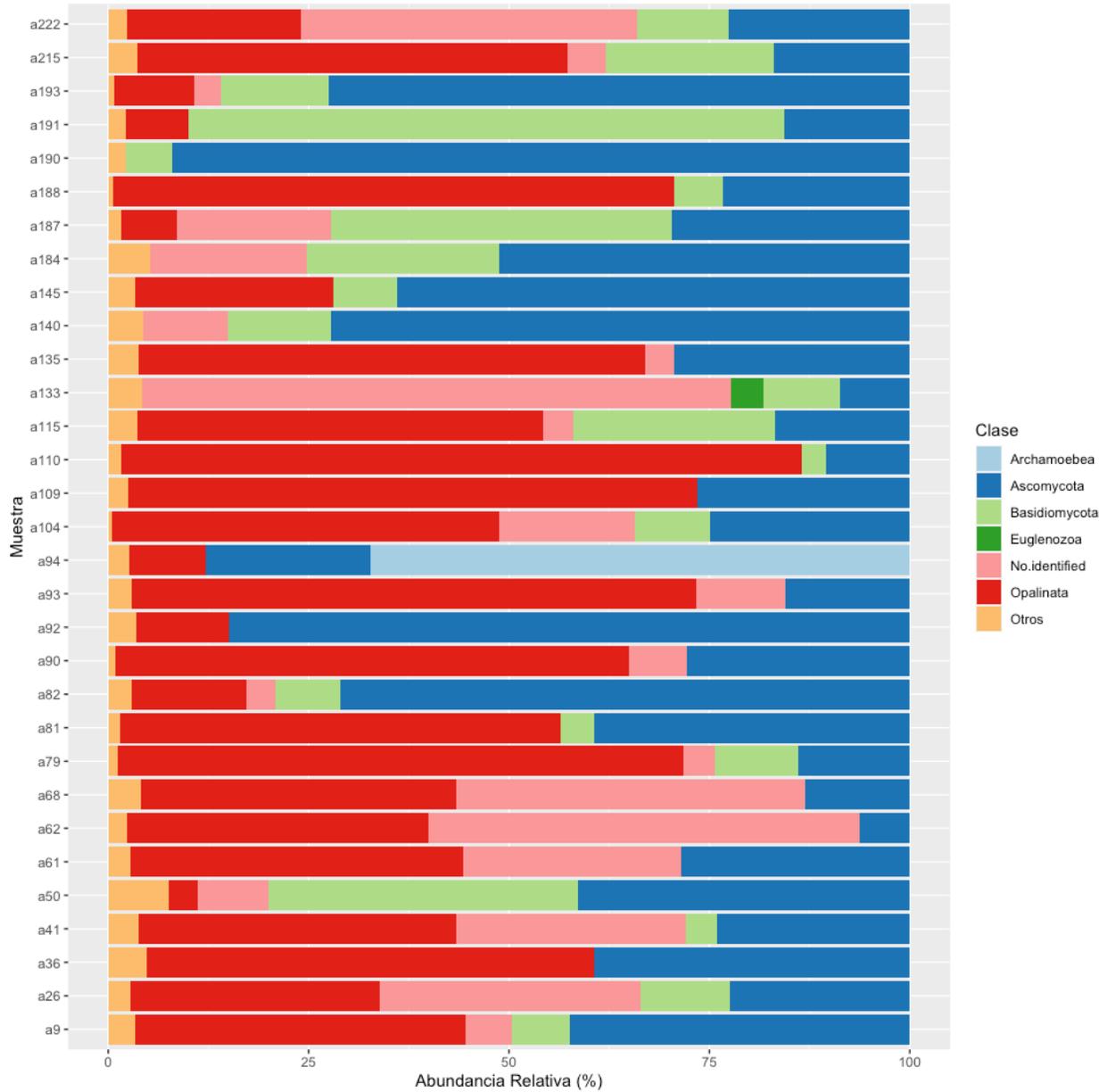


Figura S8. Abundancia relativa de las clases de eucariotas identificadas en cada una de las muestras del grupo con coinfección por los organismos de estudio (B+/CD+).

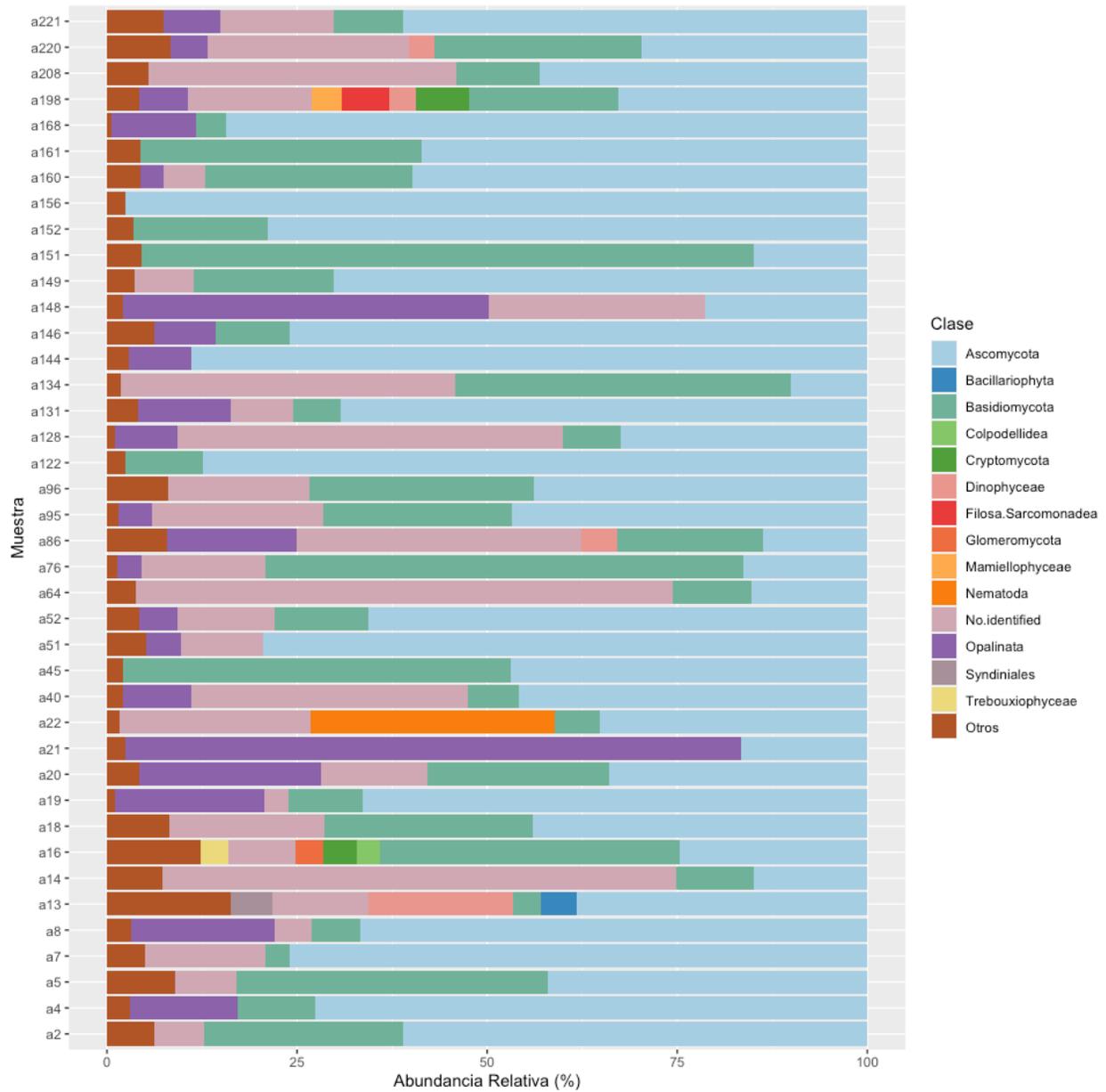


Figura S9. Abundancia relativa de las clases de eucariotas identificadas en cada una de las muestras del grupo libre de infección por los organismos de estudio (B-/CD-).

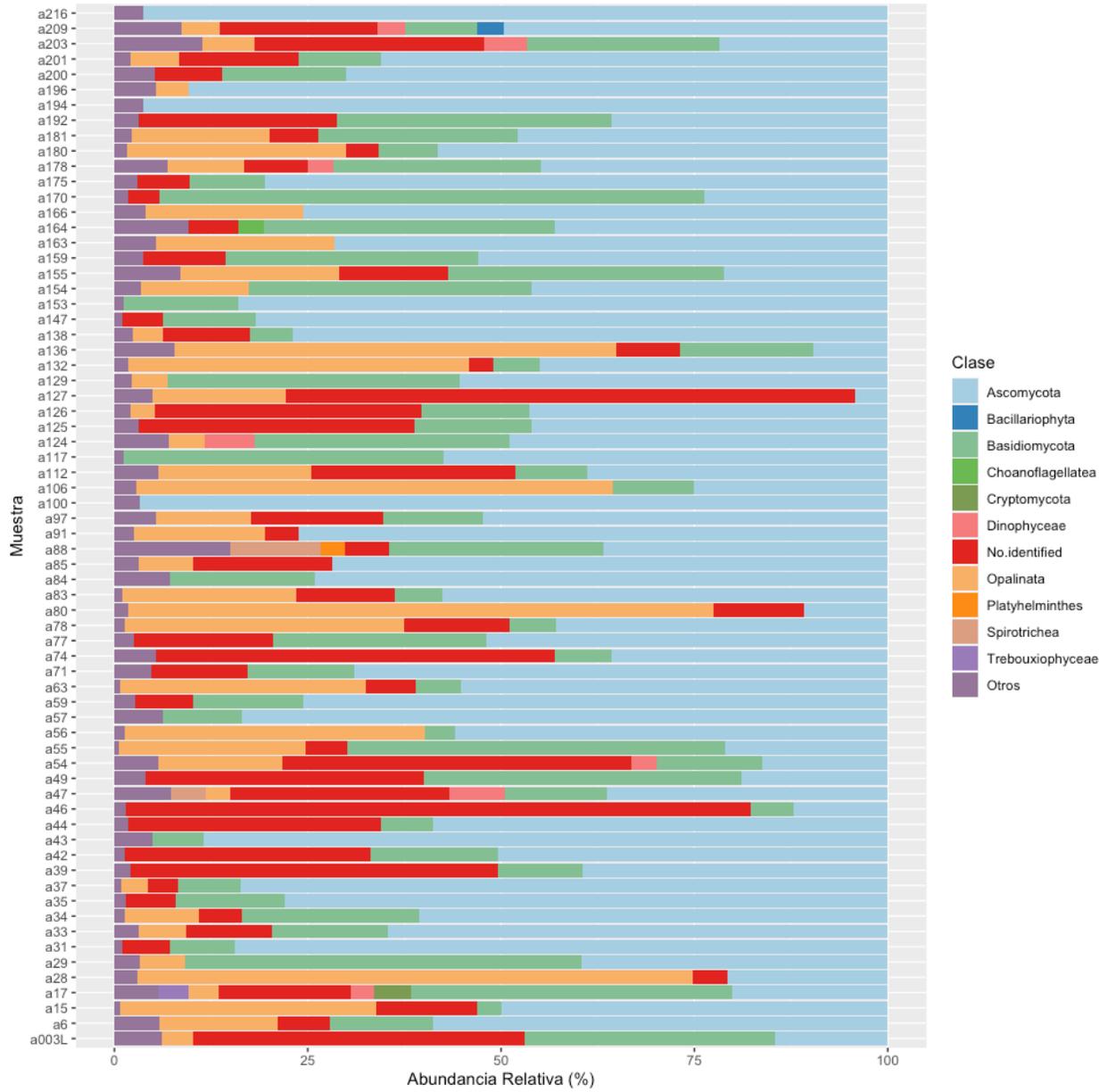


Figura S10. Abundancia relativa de las clases de eucariotas identificadas en cada una de las muestras del grupo que presenta únicamente ICD (B-/CD+).

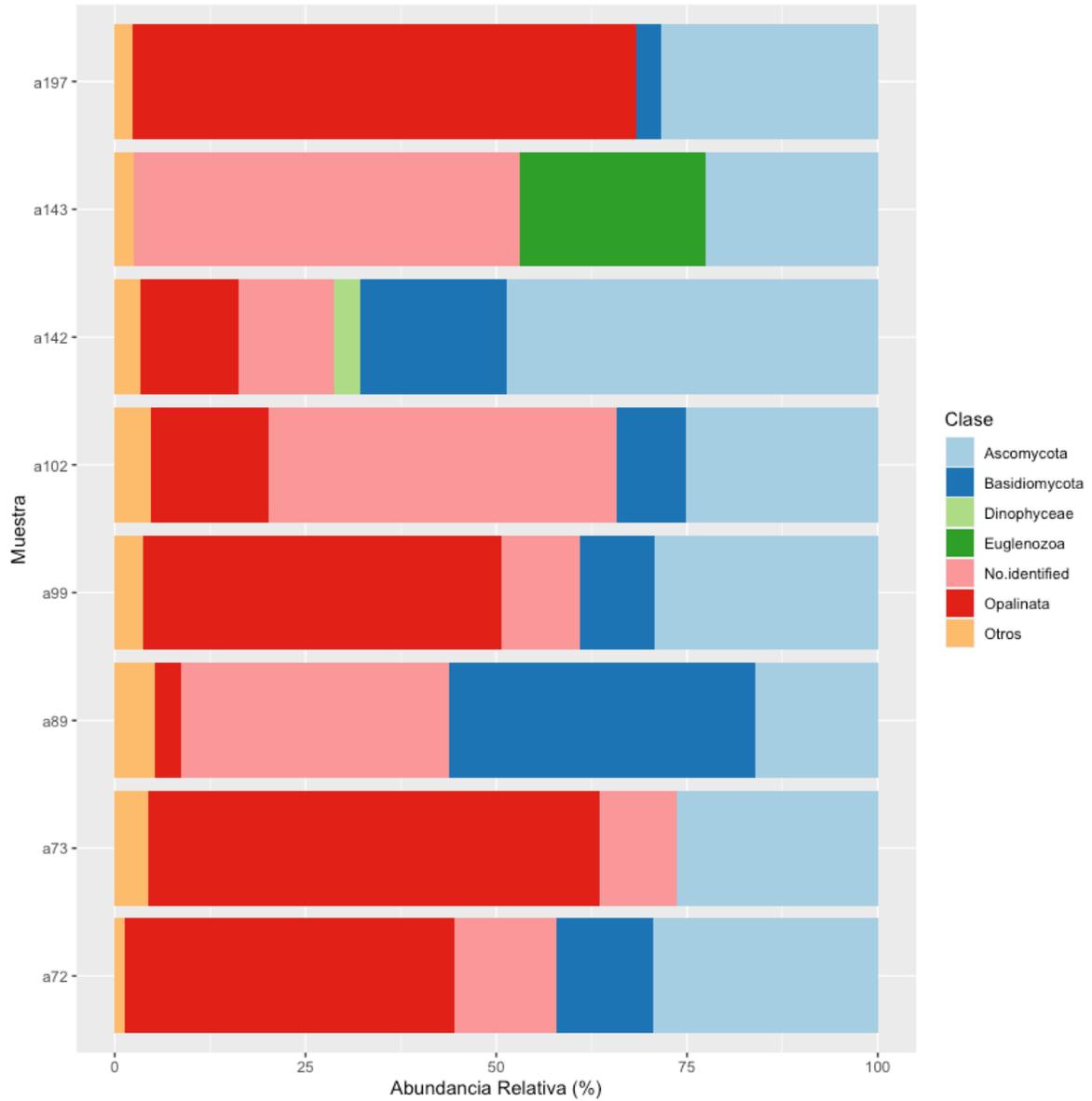


Figura S11. Abundancia relativa de las clases de eucariotas identificadas en cada una de las muestras del grupo que presenta únicamente colonización por *Blastocystis* (B+/CD-).

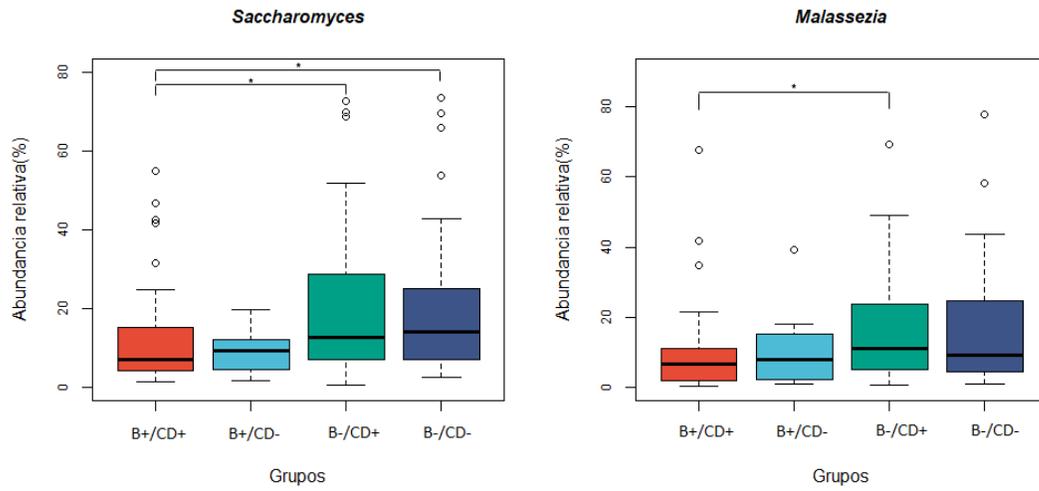


Figura S12. Variaciones en la abundancia relativa de dos géneros de hongos. Las diferencias significativas entre los grupos de estudio fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney (*, p-valor<0,05).