

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Postgrados**

**Evaluación del RT-PCR en el diagnóstico de 6 parásitos intestinales en un  
área con parasitismo de baja intensidad en el Trópico, Ecuador**

**Jorge Aníbal Reyes Chacón MD.**

**Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Máster en  
Microbiología**

**Quito, Septiembre del 2012**

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Posgrado**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Evaluación del PCR en tiempo real en el diagnóstico de 6 parásitos  
intestinales en un área con parasitismo de baja intensidad en el Trópico,  
Ecuador**

**JORGE REYES CHACÓN**

Philip Copper, Ph.D.  
Director de Tesis

---

Mauricio Espinel, Ph.D.  
Miembro del Comité de Tesis

---

Gabriel Trueba, Ph.D.  
Miembro del Comité de Tesis

---

Stela de Torre, Ph.D.  
Directora del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

---

Victor Viteri Breedy, Ph.D.  
Decano del Colegio de Posgrados

---

Quito, Septiembre de 2012



© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----  
Nombre: Jorge Aníbal Reyes Chacón  
C. I.: 1717730962  
Fecha: septiembre, 2012

### **Dedicatoria**

Todo cuanto hago es por darle un futuro mejor a mi familia, mi esposa Geovanna, mi hijo Esteban, mis padres Carmen y Jorge, hermanos y sobrinos, a quienes les dedico con mucho cariño. Un homenaje especial a mis hermanos que ya no se encuentran junto a mí, Milton y Marco.

## **Agradecimientos**

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, a mis compañeras, a todos sus profesores, expresando mi profundo agradecimiento a Gabriel Trueba quien me recibió en el Instituto, a Verónica Barragán y Sonia Zapata por impartirme sus conocimientos y amistad.

A Philip Cooper quien me ha brindado un gran apoyo incondicional y guía en mi ensayo, un agradecimiento especial a su gran equipo de trabajo del laboratorio de biología molecular especialmente a mis amigas Yosselin Vicuña y Sabrina Méndez cuyos conocimientos y ayuda en el laboratorio fue esencial para el progreso de mi trabajo.

A Rojelio Mejía por sus consejos y comentarios que me ayudaron a resolver mis dudas.

A Mauricio Espinel quien formó parte del comité de tesis por sus consejos y recomendaciones.

Mi familia y amigos incondicionales a mi lado

## Resumen

**Antecedentes:** Las parasitosis intestinales son un problema de salud pública no solo por las enfermedades que pueden producir sino por los inconvenientes que presentan los métodos diagnósticos empleados. Hasta el momento la microscopía sigue siendo la prueba estándar en algunas parasitosis, sin embargo presenta inconvenientes de sensibilidad en zonas de baja intensidad de infección parasitaria.

**Objetivo:** En el presente estudio se evaluó al Real Time PCR (RT-PCR) para la investigación de *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Necator americano* y *Anquilostoma duodenalis* en heces en un área endémica en la Provincia de Esmeraldas.

**Métodos:** Se recolectaron muestras de heces procedentes de mujeres embarazadas a las que se realizó pruebas microscópicas en fresco, Kato-katz, concentrado formol-eter y cultivo. El ADN se extrajo de las muestras de heces utilizado FAST DNA Spin kit for soil (MP Biomedicals), en cada reacción se utilizó FastStart Taq DNA polimerasa, las secuencias fueron amplificadas en el equipo Fast Real-Time PCR 7500.

**Resultados:** Los resultados del estudio indicaron que la prevalencia por medio de RT-PCR fueron para *Entamoeba histolytica* del 1,3% (25,6% por análisis en fresco + concentrado), *Giardia intestinalis* 5.1% (5,1% en fresco + concentrado), *Ascaris lumbricoides* 16% (23,3% por Kato-Katz + concentrado), *Strongyloides stercoralis* 4.1% (2.2% por cultivo) y uncinarias 1.7% entre los cuales 2 casos correspondían a *Necator americano* y 1 a *Anquilostoma duodenalis* (2.7 % por Kato-Katz + concentrado). Cuando se comparó la sensibilidad y especificidad del RT-PCR con la microscopia se encontró para *Giardia intestinalis* del 25%-95.5%, *Ascaris lumbricoides* del 55%-94.1%, *Strongolides stercoralis* del 25%-96% y uncinarias del 25%-98% respectivamente. Para *Entamoeba histolytica* no se determinó sensibilidad y especificidad.

**Conclusiones:** El diagnóstico de parásitos intestinales por medio RT-PCR en personas con parasitismo de baja intensidad presenta una sensibilidad reducida pero con alta especificidad con respecto a las técnicas microscópicas, estos resultados son importantes en cuanto al uso de técnicas moleculares en estudios de campo.

## Abstract

**Background:** The intestinal parasitism is a problem of public health, not only because of the illness that can produce but also the disadvantages of diagnostic techniques. So far the microscopy is still the standard test in some infections, however it has some inconvenient of sensibility in zones of low intensity of parasitic infection.

**Objective:** In the present study, the Real Time PCR (RT-PCR) was assessed for the investigation of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Necator americano* and *Anquilostoma duodenalis* in stool samples in an endemic area in the province of Esmeraldas.

**Methods:** We collected fecal samples from pregnant women and realized microscopic tests in fresh, Kato-Katz, concentrated of formol-ether and culture. The DNA was extracted from the fecal samples using FAST DNA spin kit for soil (MP Biomedicals) in each reaction we used FastStart Taq DNA polymerase and the sequences were amplified in the Fast Real-Time PCR 7500.

**Results:** The results of this study indicated that the prevalence by the RT-PCR were for *Entamoeba histolytica* in 1.3% (25.6% for fresh analysis + concentrate), *Giardia intestinalis* 5.1% (5.1% fresh + concentrate), *Ascaris lumbricoides* 16% (23,3 % by Kato-Katz + concentrate), *Strongyloides stercoralis* 4.1% (2.2% in culture) and hookworms 1.7%, including 2 cases to *Necator Americanus* and 1 to *Anquilostoma duodenalis* (2.7 % Kato-Katz + concentrated). When we compared the sensibility and specificity of RT-PCR with the microscopy we found for *Giardia intestinalis* 25% -95.5%, *Ascaris lumbricoides* 55% -94.1%, *Strongolides stercoralis* 25% -96% and hookworms 25% -98% respectively. Sensibility and specificity for *Entamoeba histolytica* was not determined.

**Conclusions:** The diagnostic of intestinal parasites by RT-PCR in people with low parasitism intensity has a low sensibility but with high specificity with respect to the microscopic techniques, these results are important in the use of molecular techniques in field studies.



## Índice

<b>1.</b>	Introducción.....	1
<b>2.</b>	Antecedente.....	2
	2.1 Protozoarios intestinales.....	2
	2.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	2
	2.1.1.1 epidemiología, ciclo de vida y clínica.....	2
	2.1.1.2 Diagnóstico.....	4
	2.1.1.3 PCR y RT-PCR en <i>E. histolytica</i> .....	5
	2.1.2 <i>Giardia intestinalis</i> .....	7
	2.1.2.1 epidemiología, ciclo de vida y clínica.....	7
	2.1.2.2 Diagnóstico.....	8
	2.1.2.3 PCR y RT-PCR en <i>Giardia intestinalis</i> .....	9
	2.2 Helmintos.....	10
	2.2.1 <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	10
	2.2.1.1 Epidemiología, ciclo de vida y clínica.....	10
	2.2.2 Uncinarias.....	11
	2.2.2.1 Epidemiología, ciclo de vida y clínica.....	11
	2.2.3 Diagnóstico de <i>Ascaris</i> y uncinarias.....	12
	2.2.4 PCR y RT-PCR en <i>Ascaris</i> y uncinarias.....	13
	2.2.5 <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	14
	2.2.5.1 Epidemiología, ciclo de vida y clínica.....	14
	2.2.5.2 Diagnostico.....	15
	2.2.5.3 PCR y RT- PCR en <i>Strongyloides sp.</i> .....	15
	2.3 PCR en tiempo real tecnología Taqman 1.....	16
<b>3.</b>	Justificación y Objetivos.....	17
	3.1 Objetivo General.....	18
	3.2 Objetivos específicos.....	18
<b>4.</b>	Hipótesis.....	18

<b>5.</b>	Población, materiales y métodos. ....	20
<b>6.</b>	Resultados. ....	23
6.1	Prevalencia protozoarios.....	23
6.2	Prevalencia Helmintos.....	24
6.3	Eficiencia del RT-PCR . ....	27
<b>7.</b>	Discusión de resultados. ....	29
<b>8.</b>	Conclusiones y recomendaciones. ....	32
<b>9.</b>	Referencias.....	33
<b>10.</b>	Anexo A. Registro de reacciones de RT-PCR de las muestras, controles y estándares. ....	42
<b>11.</b>	Anexo B. Tablas de contingencia de las pruebas.....	43

## Tablas

**Tabla 1.** Distintos protocolos de PCR en tiempo real para identificación de *E. histolytica* y *E. Dispar* reportados en varios estudios.

**Tabla 2.** Clasificación de la intensidad de la infección según OMS por medio del Kato-Katz.

**Tabla 3.** Sondas y primers utilizados con sus respectivos gen blancos, para *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis*.

**Tabla 4.** Eficiencia del RT-PCR frente a técnicas microscópicas en 4 parásitos intestinales

## Figuras

**Figura 1.** PCR en tiempo real tecnología Taqman 1, con sondas marcadas

**Figura 2.** Prevalencia de complejo *E. histolytica/E dispar/E. moshkovskii* por técnicas microscópicas y *E. histolytica* por medio del RT-PCR en 156 muestras de heces.

**Figura 3.** Prevalencia de *G. intestinalis* determinada por medio de microscopía y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 156 muestras de heces.

**Figura 4.** Prevalencia de *Ascaris lumbricoides* por medio de 2 placas de Kato-Katz, concentrado y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 173 muestras de heces.

**Figura 5.** Prevalencia de uncinarias por medio de 2 placas de Kato-katz , concentrado, cultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 158 muestras de heces.

**Figura 6.** Prevalencia de *Strongyloides Stercoralis* determinada por concentrado, cultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 197 muestras.



## 1.- INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias han acompañado a los humanos durante toda su historia, ya que han sido descritas hace muchos años atrás como se puede observar en el papiro de Ebers, 1500 A.C. o descritos por médicos como Hipócrates 3000 a 200 A.C. al igual que el hallazgo de huevos calcificados de helmintos en coprolitos de momias que datan de 200 a.c. (1, 2). La tenias por ejemplo las trajeron los humanos a América desde el África hace 50.000 años y les transmitieron a los bovinos y porcinos (3).

Actualmente las parasitosis intestinales siguen siendo un problema de salud pública, según la organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente el 10% de personas en países en vías del desarrollo están infectadas especialmente en los trópicos (4). Entre los principales parasitosis que afectan al intestino del hombre se encuentran los protozoarios y helmintos intestinales, los que causan una mortalidad que va entre 70.000 y 50.000 personas al año respectivamente (5). Aunque la mayoría de estas infestaciones permanecen como una entidad asintomática se los ha asociado frecuentemente a múltiples alteraciones clínicas en el hospedero como la malnutrición, el retraso en el desarrollo cognitivo, anemia (especialmente en el embarazo), alteraciones intestinales como diarrea o disentería y alteraciones extra-intestinales por invasión como hígado, pulmones y cerebro (6, 7).

El diagnóstico de estas parasitosis es difícil, clásicamente en busca de formas parasitarias ya sea huevos o larvas de helmintos, quistes o trofozoitos de protozoarios intestinales. Estas formas pueden identificarse de manera directa o mediante tinciones, son métodos rápidos y simples pero con varios inconvenientes. El desarrollo de tecnología en cuanto al diagnóstico de las parasitosis intestinales ha evolucionado tanto en microscopía como en

técnicas inmunológicas y moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo convencional y en tiempo real. Estas últimas están siendo sometidos a procesos de validación frente a técnicas que hoy en día son las pruebas estándar.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1.- Protozoarios intestinales**

#### **2.1.1. *Entamoeba histolytica***

##### **2.1.1.1 Epidemiología, ciclo de vida y características clínicas**

La OMS ha reportado que aproximadamente 50 millones de personas tienen enfermedad invasiva por *Entamoeba histolytica* y alrededor de 100.000 fallecimientos al año ocurren alrededor del mundo y es el protozoario que ocupa el segundo lugar en mortalidad luego de la malaria (8).

Se han descrito muchas especies dentro del género *Entamoeba*, pero en realidad seis, *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. coli* y *E. hartmanni*, colonizan el intestino humano, de las cuales solo *E. histolytica* ha demostrado ser patógena (9), adicionalmente es casi imposible distinguirla con *E. dispar* por medio de la microscopía.

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste en 2 estadios parasitarios, un infectivo que es el quiste y otro vegetativo el trofozoito. El quiste mide entre 10–15  $\mu\text{m}$  de diámetro y típicamente contiene 4 núcleos lo que ha servido para su diferenciación de su similar *E. coli*, con 8 núcleos. Mientras que el trofozoito tiene similares diámetros pero con un solo núcleo y un cariosoma, este último sirve para la diferenciación de otros géneros. El quiste de *E.*

*histolytica* es resistente a la acidificación, cloración y desecación, siendo capaz de resistir y permanecer infectivo por varias semanas contaminando agua y alimentos. Cuando el humano los ingiere el quiste es conducido al intestino delgado donde ocurre la desenquistación seguida de mitosis para dar origen a 8 trofozoitos que colonizaran el ciego y el resto del colon donde se adhieren a las capas del epitelio de la mucosa colónica (10).

Se han descrito tres tipos de moléculas en *E histolytica* que le permiten producir sus efectos en el hospedero:

- **Lectinas Gal/GalNAc**, expresadas en el trofozoito, reconocen a residuos de galactosa y N-acetylgalactosamine (GalNAc) de las células del epitelio intestinal permitiendo su adherencia y colonización (11).
- **Ameboforos**, producen lisis de las células intestinales, actúan como perforinas. Péptidos similares se encuentran en *E. dispar* pero con un bajo porcentaje de actividad (12).
- **Proteinasa de cisteína**, ampliamente encontrada en diferentes organismos multicelulares y unicelulares, en *E. histolytica* se piensa que su función es la evasión del sistema inmune además de producir efectos citopáticos en las células del hospedero (11).

Dentro de las patologías asociadas a *E. histolytica* un 90% de las personas no presentan síntomas, mientras que del 4-10% presentan trastornos compatibles con disentería y/o enfermedad extraintestinal (13), la enfermedad disentérica puede evolucionar ocasionalmente a una colitis fulminante amebiana, megacolon tóxico o fístula recto-vaginal, en cambio la amebiasis extraintestinal se encuentra el absceso hepático amebiano (14).

### 2.1.1.2 Diagnóstico

Lamb en 1859 fue quien describió por primera vez amebas en el contenido intestinal y Brunt en 1925 propuso la "existencia de dos especies morfológicamente idénticas de amebas", *E. dispar*, especie no patógena y *E. dysenteriae (histolytica)* patógena. En 1993 se llegó a definir que estas 2 especies son completamente diferentes, aunque dentro de éste diagnóstico diferencial se podría incluir a *E. moshkovskii*, un género más de tipo ambiental pero que ha sido aislada de pacientes con síntomas gastrointestinales (15,16). La existencia de las amebas no patógenas (*E. dispar* y *E. moshkovskii*) complica el diagnóstico debido a la incapacidad para poder diferenciarlas microscópicamente y ha motivado el desarrollo de técnicas que permitan una identificación de *E. histolytica* para un manejo dirigido (17). En Ecuador por ejemplo Jacobsen et al. encontró una prevalencia del 57.1% del complejo *Entamoeba histolytica/dispar* (18) en niños indígenas Ecuatorianos (por análisis microscópico en heces), pero Gatti et al. en 168 sujetos en el trópico ecuatoriano determinó por microscopia que 48 sujetos (27%) estaban colonizados por el complejo *E. histolytica/dispar*, sin embargo por medio de cultivo y análisis de zymodemos se demostró que sólo 7 personas de éstas estaban colonizadas por *E. histolytica* y 26 personas con *E. Dispar* (19). El estudio directo de heces por medio de la microscopia es el más utilizado para un diagnóstico rápido, sin embargo cuando se lo ha evaluado en áreas endémicas y no endémicas ha presentado una sensibilidad entre el 60% al 68% para la identificación del complejo *E. histolytica/E. dispar* (21,22).

El cultivo y electroforesis de isoenzimas son los métodos empleados para la diferenciación de los distintos géneros de amebas, pero por factores como su costo, tiempo empleado,



necesidad de un número elevado de células para su realización y debido a que no siempre se obtienen los resultados esperados su verdadera utilidad se la ha reservado como método de referencia (20).

La técnica de ELISA que identifica anticuerpos frente a antígenos de *E. histolytica* son empleados especialmente para afecciones extra intestinales como por ejemplo las hepáticas demostrando una sensibilidad del 97.4% y especificidad de 94.8%, sin embargo es demorado y no aplicable en áreas endémicas (23). La detección de antígenos en heces ha sido una alternativa a los métodos microscópicos ya que permite diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* con una sensibilidad de 98% y especificidad de 97% en áreas de alta endemicidad (24). Sin embargo otros reportes realizados tanto en áreas endémicas como no endémicas han reportado resultados contradictorios (25), adicionalmente este requieren heces frescas y libres de formol.

### **2.1.1.3. Técnicas moleculares, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (RT-PCR)**

Técnicas moleculares como el PCR convencional requieren laboratorios especializados, personal capacitado, equipos especiales y presentan el riesgo de contaminación lo que ocasiona falsos positivos, pero presentan una buena discriminación entre *E. histolytica* y *E. dispar* (26) incluso la identificación simultanea de los 3 géneros incluyendo a *E. moshkovskii*, consiguiendo una sensibilidad del 94% y especificidad del 100% en heces (27, 28). El RT-PCR permite superar en parte los inconvenientes presentados por el PCR convencional y brindar alternativas a los métodos tradicionales. Se han reportado protocolos de RT-PCR optimizando tiempo y con un número mayor de muestras que se pueden procesar. Adicionalmente se puede monitorizar de manera continua la amplificación del gen blanco y tener límites de detección tan bajos como 0.1 células parasitarias por gramo de heces (29).

Uno de los genes más utilizados para diagnóstico es la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA) y el que ha demostrado mayor sensibilidad y especificidad, cercana al 100% es el que utiliza la tecnología Taqman 1 que amplifica la 18S rRNA (32). Tabla 1

**Tabla 1.** Distintos protocolos de PCR en tiempo real para identificación de *E. histolytica* y *E. Dispar* reportados en varios estudios.

Ensayo/técnica	Gen blanco	Primer o sonda
Light cycler	18S rRNA	Eh-S26C Ed-27 C Eh-Ed-AS25 Eh/Ed-24LC-Red 640 Eh-Ed-25-F Ehdmf, Ehdmr Ehdm Ehd640
TaqMan 1	18S rRNA	Eh-d-239F Ehd-88R Histolytica-96T Dispar-96T
TaqMan 2	Episomal repeats (SREPH gene)	Histolytica-50F Histolytica-132R Histolytica-78T
Multiplex real time PCR	18S rRNA	Ehd-239F Ehd-88R Histolytica-96T
TaqMan 1 + bead- based Luminex assay	18s rRNA	Eh134F Eh134R

Adaptado de R. Fotedar, 2007: 29-30

## 2.1.2 *Giardia intestinalis*

### 2.1.2.1 Epidemiología, ciclo de vida y cuadro clínico

Se trata de uno de los protozoarios intestinales más comunes que afectan al humano, se estima que aproximadamente  $2.8 \times 10^6$  personas se infectan anualmente, en Ecuador se ha reportado

por medio de microscopia una prevalencia el 11.1% al 18.5% tanto en la región costa como en la región sierra respectivamente (34, 35).

*Giardia intestinalis* es un protozooario flagelado y binucleado, parasito de varios reptiles, aves y mamíferos (incluido el humano). Su ciclo vital tiene 2 estadios, el primero es el trofozoito el cual mide aproximadamente 15 $\mu$ m de longitud con 2 núcleos localizados anteriormente, un disco central adhesivo formado por microtúbulos, posee 4 pares de flagelos (un par anterior, 2 posteriores y un caudal). Su segunda forma parasitaria es el quiste que mide entre 10-12 $\mu$ m de longitud, relativamente resistente a la cloración y a la ozonolisis pudiendo permanecer viable por varias semanas especialmente en superficies frías. La transmisión empieza por la ingestión de los quistes presentes en agua o alimentos contaminados, pero la transmisión persona-persona es más común por la vía fecal-oral, su destino final es la colonización del duodeno donde se produce la desenquistación (36).

La infección por *Giardia intestinalis* causa sintomatología diversa que va desde formas asintomáticas, cuadros diarreicos agudos, alteraciones en crecimiento corporal, anemia (37) y hasta alteraciones en el desarrollo psicomotor en niños (38). Al parecer estos efectos estaría producidos por alteraciones en el epitelio intestinal como son: mala absorción de glucosa, agua y electrolitos, reducida actividad de las disacaridasas y pérdida de la barrera epitelial por inducción de apoptosis de los enterocitos (39). Sin embargo la enfermedad diarreica aguda es la presentación más común.

Genotípicamente a *Giardia intestinalis (lamblia)* se lo puede clasificar dentro de 7 grupos (A, B, C, D, E, F y G) basados en la caracterización de tres genes: que codifican a glutamato deshidrogenasa (*gdh*), la pequeña subunidad ribosomal SSU, rRNA y triosafosfato isomerasa

(*tpi*). Los grupos A y B infectan a humanos, perros, gatos y mamíferos salvajes. Dentro del Grupo A se han dividido en subgrupos I y II a éste último se lo ha asociado con enfermedad diarreica aguda especialmente en niños menores de 5 años (42,43). El genotipo del grupo B se ha encontrado con mayor frecuencia y se asocia con enfermedad asintomática (41) sin embargo los subgrupos III y IV, han sido asociados a enfermedad diarreica en humanos (40).

### **2.1.2.2 Diagnóstico**

El análisis microscópico es el método de elección, aunque la eliminación de sus formas parasitarias de una manera intermitente reduce su sensibilidad (44). Una de las alternativas recomendadas es la recolección de varias muestras para incrementar la capacidad de detección (45), aunque en personas con alta carga parasitaria de 1 - 2 muestras podría ser suficiente para alcanzar sensibilidades entre 72% al 92% respectivamente (46), no obstante el tiempo que toma en realizar el examen (métodos por concentración), la colaboración del paciente y el entrenamiento del personal sigue siendo un gran inconveniente. Para superar los inconvenientes de técnicas microscópicas se han desarrollado procedimientos basadas en anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos, como la inmunocromatografía, con ventajas como rapidez en su realización, no necesitar equipos sofisticados y presentando sensibilidades hasta un 82% y especificidad del 98%, sin embargo la carga parasitaria presente en heces es el principal inconveniente que afecta su eficiencia (47, 48). Enzima inmunoensayos (EIA) que detectan antígenos solubles en heces han mostrando sensibilidad superior al 90% y especificidad del 99%, con buena correlación con la inmunofluorescencia la misma que para algunos autores es el método referencia (49). Sin embargo el EIA también se ve afectado por la carga parasitaria presente en heces y la necesidad de analizar más de una

muestra para conseguir resultados satisfactorios debido a los resultados falsos negativos que pueden presentar (48).

### **2.1.1.3. PCR y PCR en tiempo real**

Métodos basados en la PCR para el diagnóstico de *Giardia intestinalis* en heces se basan en la amplificación de 3 genes blanco que codifican para la glutamato deshidrogenasa (*gdh*), la pequeña subunidad ribosomal (SSU), rRNA y trifosfato isomerasa (*tpi*) (50). La PCR convencional no ha mostrado buenos resultados siendo superado por la microscopía, al parecer la cantidad de quistes en heces también interviene dando falsos negativos (51). Protocolos de RT-PCR Multiplex no sólo para identificar *Giardia* sino conjuntamente con el diagnóstico de *E. histolytica*, *Cryptosporidium parvum* han demostrado sensibilidades por encima del 90% y especificidad que llegan al 100%, aunque no se han reportado límites de detección en las muestras de heces. El gen blanco en estos ensayos ha sido el de la subunidad ribosomal 18S rRNA, utilizando sondas fluorescentes (tecnología Taqman 1) (52, 53).

## **2.2 Helmintos: *Ascaris lumbricoides*, uncinarias y *Strongyloides stercoralis***

### **2.2.1 *Ascaris lumbricoides***

#### **2.2.1.1 Epidemiología, ciclo de vida y cuadro clínico**

Pertenece al grupo de nemátodos caracterizados por que sus huevos necesitan permanecer en el suelo ya sea con humedad y/o calor para poder ser infectivos. Se estima que

aproximadamente 1 billón de personas están infectadas alrededor del mundo con éste helminto y en Ecuador hasta el 63% de personas estarían infestadas especialmente en áreas tropicales y rurales (54).

Para adquirir la infección las personas deben ingerir los huevos infectivos, ya dentro del intestino liberar una larva que atraviesa la pared intestinal y pasando por hígado llega a los pulmones, antes de pasar a la epiglotis las larvas son deglutidas para ingresar nuevamente al aparato gastrointestinal y convertirse en adultos capaces de producir huevos para ser eliminados con las heces al suelo completando así el ciclo. Éste proceso desde la ingestión de los huevos hasta el estadio de adultos puede durar entre 9-11 semanas (10).

En general la infección crónica por nematodos en niños se ha asociado a patologías como malnutrición, retardo del crecimiento, retardo intelectual, déficit cognitivo, casos aislados de apendicitis y colangitis por obstrucción mecánica. Mientras que una infección aguda puede causar síntomas debido a la migración larvaria como una neumonitis (55).

## **2.2.2 Uncinarias**

### **2.2.2.1 Epidemiología, ciclo de vida y cuadro clínico**

*Necator americano* y *Ancylostoma duodenal* son los 2 géneros de uncinarias que infestan al humano, aproximadamente unas 700 millones de personas están infestadas alrededor del

mundo, en Ecuador por medio de microscopía se han encontrado prevalencias variadas entre 24.1% en la Amazonía mientras que en la región Costa en Guayas 0.6% y en Esmeraldas 2.3% (35, 54)

Similar a lo que sucede con *A. lumbricoides*, los huevos de las uncinarias dependen del suelo para su desarrollo en el cual eclosionan para liberar una larva de primer estadio, ésta muda dos veces hasta llegar al tercer estadio el cual es el infectivo, no se alimenta, es muy motil y busca contacto con la piel de su futuro hospedero la cual es penetrada hasta llegar a las vénulas subcutáneas y vasos linfáticos así alcanzar la circulación general llegando a los capilares pulmonares donde son atrapadas, ingresan a los pulmones, llegan a la epiglotis y migran al aparato gastrointestinal. Cerca de 5 a 9 semanas son necesarias para llegar al estadio adulto capaz de eliminar huevos desde su contacto con la piel (55).

Entre las principales complicaciones de la infestación por uncinarias es la pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal, especialmente del intestino delgado causando anemia por deficiencia de hierro no sólo en niños sino también en mujeres embarazadas, mientras que en personas adultas se la ha asociado a una malnutrición hipoproteica (56).

### **2.2.3 Diagnóstico de *Ascaris lumbricoides* y uncinarias**

Técnicas como el Kato-Katz son recomendadas por la OMS para la evaluación de la intensidad de la infección por helmintos, especialmente en estudios de campo por su facilidad

para realizarlo y su bajo costo. Se utiliza aproximadamente 41.7mg de heces por muestra para ser observada al microscopio luego de lo cual se puede obtener un estimado del número de huevos presentes por gramo de heces (hpg), multiplicando el contaje de huevos por una constante de 24.000, lo que permite estratificar la intensidad de la infección en leve, moderada y severa como se demuestra en la Tabla2 (57).

**Tabla 2.** Clasificación de la intensidad de la infección según OMS por medio del Kato-Katz.

	Baja intensidad (hpg)*	Moderada intensidad (hpg)	Severa intensidad (hpg)
<i>A. lumbricoides</i>	1-4.999	5.000-49.999	> 50000
<i>T. trichiura</i>	1-999	1000-9.999	>10.000
<i>uncinarias</i>	1-1.999	2.000 – 3.999	>4.000

\***hpg:** huevos por gramo de heces

Se ha evaluado la eficacia del Kato-Katz en áreas endémicas encontrando para *A. lumbricoides* una sensibilidad y especificidad que supera el 96% con sólo una muestra, mientras que para *uncinarias* una sensibilidad del 62% con una especificidad que llega al 93.8% (58), lo contrario ocurre en áreas no endémicas donde las personas tienen una eliminación de huevos de leve intensidad, demostrando la necesidad de recolectar 3 muestras consecutivas para alcanzar buenos resultados, es más el diagnóstico de *uncinarias* en estos pacientes se observan sensibilidades menores al 20% (59). Los factores que se asocian a estos resultados son la variación día a día en la eliminación de huevos, la identificación errónea por parte del técnico no entrenado y en el caso de los huevos de *uncinarias* su rápida desintegración (60) y con respecto a la técnica la escasa colaboración de las personas para recolectar las 3 muestras consecutivas.



## **2.2.4 PCR y PCR en tiempo real**

Existen pocos estudios sobre PCR en el diagnóstico de helmintos, se ha desarrollado técnicas basadas en el PCR en tiempo real (multiplex) para la identificación conjunta de helmintos y protozoarios en muestras de heces provenientes de personas con síntomas gastrointestinales, presentando una especificidad cercana al 100% y una sensibilidad del 80%, teniendo como gen blanco para *Ascaris lumbricoides* a la región interna transcrita 1 del ADN ribosomal (rDNA), por medio de tecnología Taqman 1 con sondas marcadas (33, 61).

La incapacidad de poder distinguir solo con la observación de huevos por la microscopia el tipo de uncinaria ya sea *Ancylostoma duodenal*, *Necator americanus* o *Oesophagostomum bifurcum*, éste último una rara zoonosis en África, ha propiciado el desarrollo de nuevas técnicas como el coprocultivo en busca de larvas L3 para su diferenciación, sin embargo esta técnica es laboriosa, demorada, requiere heces frescas y técnicos experimentados. El PCR permite diferenciar las tres especies amplificando la región interna transcrita 2, del ITS-2, del ADN ribosomal, demostrando buenos resultados (62). Un ITS es una secuencia conservada no codificante que separa las secuencias codificantes de las subunidades ribosomales, 18S, 5.8S y 28S en el caso de células eucariotas, éstas secuencias ITS son eliminadas cuando el pre-RNA es procesado para formar un RNA maduro (79).

## **2.2.5 *Strongyloides stercoralis***

### **2.2.5.1 Epidemiología, ciclo de vida y cuadro clínico**

Se encuentra dentro de los helmintos que cumple una fase de su ciclo biológico en el suelo, se trata de un nematodo que afecta entre 70-100 millones de personas, en Ecuador se ha reportado una prevalencia del 0.7% en niños indígenas por medio de la microscopía (18).

Existen 2 especies de *Strongyloides*: *S. stercoralis* y *S. fuelleborni*, de éste último los primeros casos fueron descritos en Papua New Guinea y de manera aislada en África, a diferencia de *S. stercoralis* quien posee una amplia distribución geográfica (63).

Dentro de su ciclo de vida, solo los parásitos hembras se encuentran en el hospedero dentro de la submucosa del duodeno produciendo docenas de huevos embrionados al día, éstos eclosionan dentro del lumen intestinal produciendo larvas en primer estadio que son eliminadas con las heces, en el ambiente se desarrollan ya sea en larva de tercer estadio o adultos machos o hembras. De manera alternativa algunas larvas aún dentro del lumen intestinal pueden desarrollarse a larvas de tercer estadio (sin necesidad de tomar contacto con el suelo) conduciendo a la reinfección atravesando la mucosa intestinal o piel perianal, llevando a una infección crónica. Las larvas que se desarrollan en el ambiente y los adultos de vida libre se reproducen de manera sexual produciendo larvas de tercer estadio que son infectantes y una vez que toman contacto con la piel del hospedero la atraviesan alcanzando la circulación mayor llegando a pulmones y vías respiratorias para luego ser deglutidas y finalmente llegar al intestino delgado donde maduran en parásitos adultos hembras productoras de huevos (64).

Entre las presentaciones clínicas se encuentra la infección intestinal crónica, autoinfección asintomática, autoinfección sintomática y síndrome de hiperinfección con diseminación. La hiperinfección es la más amenazante para la vida presentando tasas de mortalidad que llegan al

78% en pacientes inmunocomprometidos que toman corticoides, personas con HIV, HTLV-1 y Linfoma (65).

### **2.2.5.2 Diagnóstico**

Al momento no existe un método estándar para el diagnóstico de *Strongyloides sp.*, el cultivo en agar en placa ha mostrado ser la técnica más eficiente ya que puede identificar otros parásitos como uncinarias y es necesario una escasa cantidad de muestra, sin embargo debido a la necesidad de tener un laboratorio equipado, personal entrenado y el tiempo que lleva la técnica ha sido un limitante para su empleo (66,67). El método de Bearmann también es útil y eficiente para la identificación de larvas aunque el cultivo sigue siendo el de mayor eficiencia (68), métodos de concentración en formol- éter aumenta la sensibilidad en la identificación de larvas, pero Kato-Katz o la observación directa de heces en fresco tienen baja sensibilidad (69). La eliminación de manera intermitente de larvas de *Strongyloides stercoralis* ha llevado a la recomendación que se recolecten hasta 7 muestras consecutivas para incrementar la sensibilidad por medio de la microscopía (70,71).

### **2.2.5.3 PCR y PCR en tiempo real**

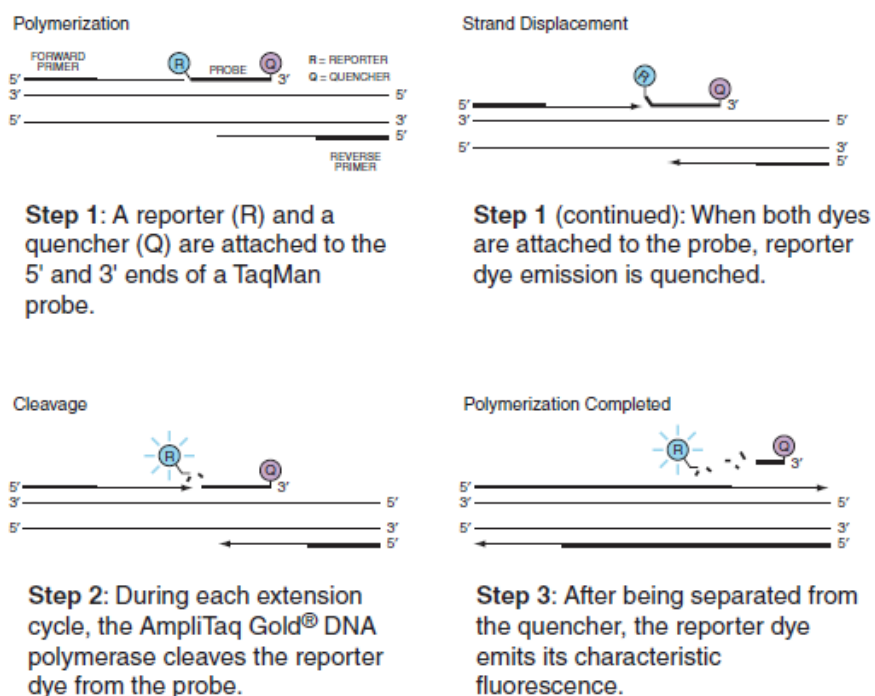
El diagnóstico de *S. stercoralis* por técnicas moleculares como el PCR en tiempo real ha mostrando ciertas características como un límite de detección bajo, una alta sensibilidad y especificidad que llega al 100% y ser más efectivo frente al método de sedimentación de Bearmann (72,73), el gen de la subunidad pequeña ribosomal 18S es el más utilizado. El RT-PCR multiplex se ha ensayado presentando buenos resultados ya que no solamente se puede identificar *S. stercoralis* sino de otros helmintos transmitidos por el suelo, su eficacia ha sido evaluada comparando con la observación de larvas en heces de manera directa (61).

## 2.3 PCR en tiempo real, tecnología Taqman

El análisis cualitativo y cuantitativo de secuencia de ADN por medio del PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta muy útil en el estudio de microorganismos.

Ésta técnica utiliza la actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa durante la fase de extensión en la PCR en tiempo real, además de utilizar una sonda de hibridación marcada en sus dos extremos con fluorocromos, el primero es el reportero, [FAM (i.e., 6 - c a r b o x y f l u o r e s c e i n ) y su espectro de emisión es disminuido (quenched) por un segundo fluoróforo por ejemplo TAMRA (i.e., 6 - c a r b o x y - t e t r a m e t h y l - r h o d a m i n e ), la degradación de la sonda de hibridación por la nucleasa libera al primer fluoróforo de la inhibición produciendo un pico de emisión fluorescente (74). fig. 1

**Figura 1.** PCR en tiempo real tecnología Taqman 1, con sondas marcadas.



### **3. Justificación y objetivos**

El diagnóstico y la determinación de la prevalencia de enfermedades infecciosas parasitarias por lo general han sido determinadas por medio de técnicas microscópicas que por varios años se han considerado como el método de elección en estudios de campo, sin embargo estas presentan varios inconvenientes ya sea por factores inherentes a la técnica, el observador o a la variación biológica que cada parásito presenta dentro de su ciclo de vida, lo que ha conducido a la búsqueda de métodos más eficientes.

El RT-PCR se ha mostrado como una alternativa presentando varias ventajas frente a métodos convencionales. En Ecuador no se han realizado estudios de prevalencia de parásitos por medio de técnicas moleculares, ni tampoco se ha evaluado su eficiencia en pacientes con infecciones parasitarias de leve intensidad. En el presente estudio se analizarán muestras de heces humanas en busca de parásitos por medio de PCR en tiempo real.

### 3.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia de 5 parásitos intestinales en un área del trópico ecuatoriano por medio del PCR en tiempo Real y compararla con métodos microscópicos

#### 3.1.1 Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de 2 protozoarios intestinales, *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* utilizando PCR en tiempo real.
- Determinar la prevalencia de helmintos transmitidos por el suelo, *Ascaris lumbricoides*, uncinarias y *Strongyloides stercoralis* por medio del PCR en tiempo real.
- Establecer la eficacia del PCR en tiempo real en cuanto a sensibilidad y especificidad en un área de infecciones parasitarias de baja intensidad.

### 4. Hipótesis

- La prevalencia de parásitos intestinales determinada por PCR en tiempo real es diferente a la reportada por medio de la microscopia.
- La sensibilidad del PCR en tiempo Real para la identificación de parasitosis intestinales es superior a las técnicas microscópicas.

## 5. Población, materiales y métodos

**Población:** El presente estudio fue realizado en Ecuador, Provincia de Esmeraldas, cantón Quinindé, parroquia Rosa Zarate, según datos del INEC con una población de 67.259 personas, se encuentra ubicado en el centro norte del país ubicado a 0.33° norte latitud, 79.47° Oeste longitud y sobre 176 metros altitud por encima del nivel del mar, con un clima cálido que llega a los 28 grados centígrados de temperatura promedio, algunas zonas no cuentan con agua potable o alcantarillado. Se tomaron en cuenta las muestras de heces provenientes de mujeres embarazadas y durante el parto quienes se encuentran reclutados en la cohorte de nacimientos, ECUAVIDA. El estudio fue aprobado por los comités de bioética de la Universidad San Francisco de Quito, Hospital Pedro Vicente Maldonado y St George's University of London.

**Muestras:** Se recolectaron 3 muestras consecutivas que se sometieron al análisis microscópico, el mismo que se lo hizo en tres fases: 1) análisis microscópico directo, luego de colocar una gota de solución salina en el centro de la placa porta objetos se tomó una pequeña porción de heces (2 mg), se coloca un cubreobjetos para observar al microscopio, 2) Kato-Katz, protocolo recomendado por la OMS para detección y cuantificación de huevos de geohelminths y 3) análisis de concentrado fecal por el método de la técnica formol-ether. Además de lo anotado las muestras de heces se sometió al cultivo en carbón activado dentro de una caja petri, para permitir el desarrollo de larvas adicionando 0.5gr de heces con un periodo de incubación entre 7 y 14 días a una temperatura de 25 a 30 °C, luego de lo cual se

procedía a observar larvas en la tapa de la caja petri. Una alícuota adicional se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para extracción de ADN y ensayos de PCR en Tiempo Real.

**Extracción de ADN:** La extracción de ADN genómico de heces se realizó con el kit FastDNA® SPIN Kit for Soil, brevemente, a un tubo con PBS buffer se adicionó 250 mg de heces junto con una matriz de sílica y cerámica para luego ser sometidos a movimientos de 60 metros/segundo durante 40 segundos en el FastPrep® Instrument, luego de centrifugar el tubo, al sobrenadante se adicionó la solución de precipitación de proteínas y nuevamente se centrifugó, nuevamente al sobrenadante producido se adicionó solución matriz con sílica para precipitar el ADN, a ésta suspensión se lo transfirió a una columna filtro (SPIN) y resuspendió el ADN en agua destilada. Por cada grupo de 15 muestras sometidas a extracción se realizó un control negativo (sin heces) para comprobar la existencia de contaminación cruzada. La medición de la cantidad y calidad del ADN se realizó por medio de NanoDrop 1000 spectrophometer.

**PCR en tiempo real:** Se utilizó un equipo 7500 Fast Real-Time PCR, el protocolo de amplificación, brevemente, para cada muestra se utilizó 20  $\mu\text{l}$  de Master mix que contenía: Fast Start 10 $\mu\text{l}$  (FastStart *Taq* DNA polimerasa, buffer, deoxynucleotido trifosfatos [dNTPs] y  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 3.2 mM ), 0.02  $\mu\text{l}$  de primer forward (900  $\mu\text{M}$  ) y reverse (900  $\mu\text{M}$  ), 0.05  $\mu\text{l}$  de la Sonda, 6.91 $\mu\text{l}$  de agua y 3 $\mu\text{l}$  de ADN y para las reacciones de los estándar se utilizó 1  $\mu\text{l}$  de DNA control, al estándar se realizó 7 diluciones partiendo de la dilución master de 1:10. Para el análisis de Ct se tomo como límite superior de 38 ciclos como referencia para clasificarlos dentro de muestras positivas. Primers y sondas se sintetizaron según las secuencias de genes blancos presentadas en la Tabla 3.



**Tabla 3.** Sondas y primers utilizados con sus respectivos gen blancos, para *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* y *Strongyloides stercoralis*.

PARÁSITO	GEN BLANCO	PRIMER FORWARD, REVERSE Y SONDA	SECUENCIAS
<i>Entamoeba histolytica</i>	18S rRNA	E. histo Forw (1974-2001)	5'-GTTTGTATTAGTACAAAATGGCCAATTC
		E. histo Rev (2026-2049)	5'-TCGTGGCATCCTAACTCACTTAGA
		E.histo-probe (2005-2024)	FAM-5'-CAATGAATTGAGAAATGACA-3'-MGB-NFQ
<i>Giardia intestinalis</i>	16S rRNA	GlambFWD	5'- CATGCATGCCCGCTCA
		GlambREV	5'-AGCGGTGTCCGGCTAGC
		Glambprobe	FAM -5'- AGGACAACGGTTGCAC- 3'-MGB-NFQ
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ITS1	ALITS FWD (32-57)	5'-TGCACATAAGTACTATTTGCGCGTAT-3'
		ALITS REV (113-97)	5'-CCGCCGACTGCTATTACATCA-3'
		ALITS Probe (62-78)	FAM-5'-GAGCCACATAGTAAATT-3'-MGB-NFQ
<i>Necator americanus</i>	ITS2	NA58F (58-79)	5'-CTGTTTGTTCGAACGGTACTTGC-3'
		Na158R (138-158)	5'-ATAACAGCGTGCACATGTTGC-3'
		NaProbe (81-100)	FAM-5'-CTGTACTACGCATTGTATAC-3'-MGB-NFQ
<i>Ancylostoma Duodenale</i>	ITS2	Ad125F (642-664)	5'-GAATGACAGCAAACCTCGTTGTTG-3'
		Ad195R (714-693)	5'-ATACTAGCCACTGCCGAAACGT-3'
		Ad155MGB (674-691)	FAM-5'-ATCGTTTACCGACTTTAG-3'-MGB-NFQ
<i>Strongyloides stercoralis</i>	18S rRNA	Stro18S-1530F (1485-1512)	5'-GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3'
		Stro18S-1630R (1585-1563)	5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3'
		Stro18S-1586T (1541-1559)	FAM-5'-ACACACCGGCCGTCGCTGC-3'-MGB-NFQ

**Análisis.** Para el análisis de prevalencia de protozoarios (*Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis*) se tomó como criterios de inclusión que la misma muestra haya sido sometida a un examen en fresco, concentrado y PCR en tiempo real, mientras que para *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* las muestras debieron ser

sometidas a Kato-Katz, concentrado y cultivo, éste último para uncinarias y en el caso de *Strongyloides stercoralis* que las muestras sean sometidas a concentrado y cultivo. Para el análisis de sensibilidad, especificidad e índice kappa se tomó como pruebas de referencia a lo siguiente: *Giardia intestinalis*: concentrado + fresco, *Ascaris lumbricoides*: Kato-Katz + concentrado, Uncinarias: Kato-Katz + concentrado + cultivo y *Strongyloides stercoralis* concentrado + cultivo. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17, Chi cuadrado de McNemar fue usado para comparar las proporciones obtenidas entre las dos técnicas, microscópicas y RT-PCR. Además de obtener sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud e índice Kappa. Un valor de  $p < 0.05$  se estableció como significativo

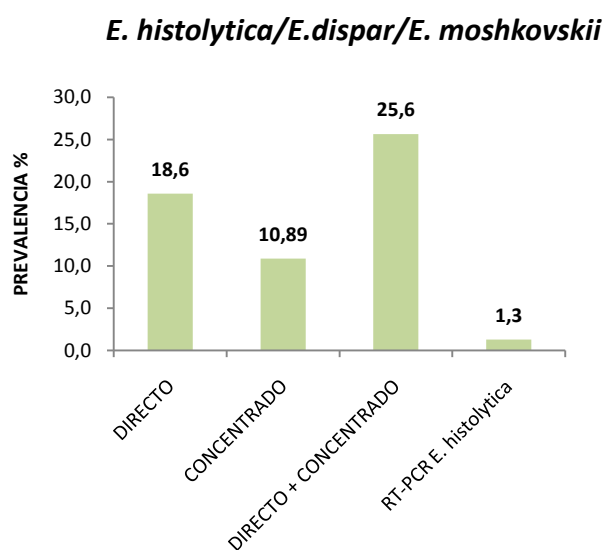
## 6. Resultados

### 6.1 Prevalencia protozoarios

De las 227 muestras recolectadas para el análisis, 156 (69%) cumplieron los criterios de inclusión basadas en las pruebas diagnósticas para la investigación de *E. histolytica* y *Giardia intestinalis*

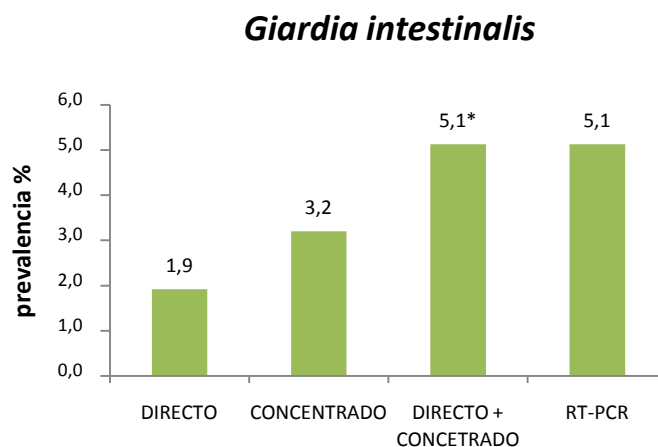
De las 156 muestras que se investigó el complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii*, 29 (18.6%) resultaron positivas por medio del examen en fresco. En el examen por concentrado 17 muestras fueron positivas (10.9%), al combinar los dos métodos el número detectado de muestras positivas fue de 40 (25,6%) y por medio del RT-PCR se detectaron 2 muestras positivas para *E. histolytica*. Figura 2.

**Figura 2.** Prevalencia de complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* por técnicas microscópicas y *E. histolytica* por medio del RT-PCR en 156 muestras de heces.



En cuanto a *G. intestinalis* de las 156 muestras analizadas, al combinar las dos técnicas microscópicas se detectaron 8 casos positivos (5.1%). En los análisis en fresco y concentrado, se identificaron 3 y 5 muestras positivas respectivamente. En el análisis mediante RT-PCR se detectaron un total de 8 casos positivos, que al parecer no son los mismos casos de los hallados por microscopía Kappa=0.2. Figura 3 y Tabla 4

**Figura 3.** Prevalencia de *G. intestinalis* determinada por medio de microscopía y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 156 muestras de heces.



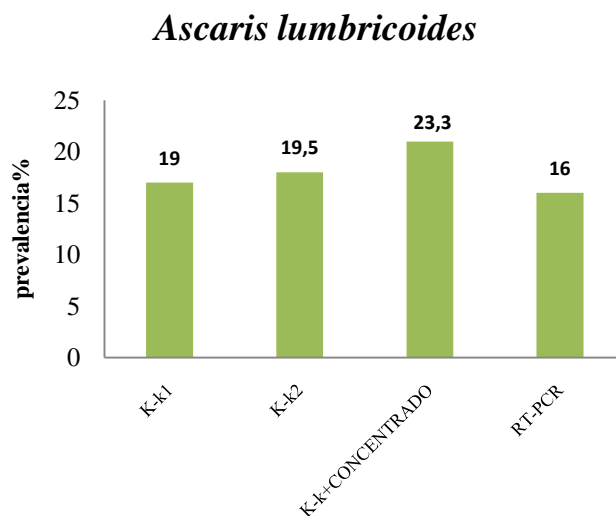
\* Porcentaje de muestras positivas para *Giardia intestinalis* por técnicas microscópicas combinadas (directo más concentrado) y RT-PCR. **P>0.05**

### 6.1.2 Helmintos

173 muestras cumplieron los criterios de inclusión para la investigación de *Ascaris lumbricoides*, las mismas que fueron sometidas a Kato-Katz en busca de huevos, el conteo de

huevos en cada muestra de heces presentó un promedio de 332 huevos por gramo de heces que corresponde a una infección de leve intensidad. El número de personas consideradas como positivas por medio de Kato-Katz para *Ascaris lumbricoides* en una placa fue de 33 (19%), para 2 placas de 34 (19.5%) y en conjunto para Kato-Katz y concentrado fue de 40 (23.3%), mientras que por medio del RT-PCR fueron 28 (16%) muestras positivas, 7% menos que las técnicas combinadas, test de McNemar  $p > 0.05$ . Sin embargo presenta una correlación kappa moderada entre pruebas. Figura 4.

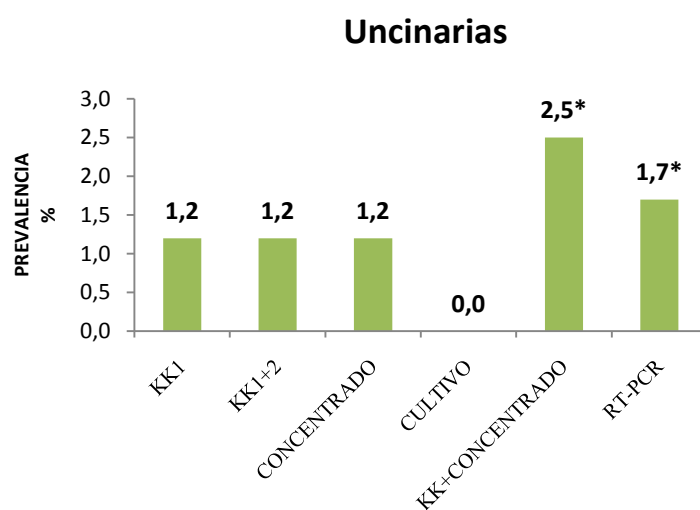
**Figura 4.** Prevalencia de *Ascaris lumbricoides* por medio de 2 placas de Kato-Katz, concentrado y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 173 muestras de heces.



En cuanto a uncinarias, 158 muestras cumplieron con los criterios de inclusión. De estas, 2 fueron positivas tanto la análisis concentrado y al Kato-Katz, sin embargo los casos positivos fueron de diferentes sujetos por lo que se incrementa su número al combinar las dos técnicas, dando 4 casos positivos. Por medio del PCR en tiempo real se encontró 3 muestras positivas,

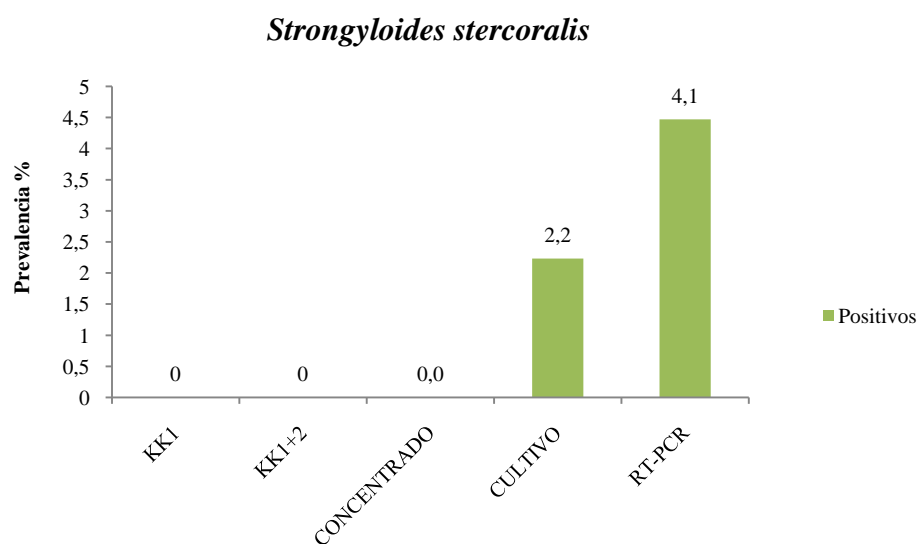
un valor inferior a lo observado con la combinación de técnicas microscópicas, test de McNemar  $p > 0.05$ . En cuanto a la identificación de la especie que es una de las ventajas principales del PCR, 1 correspondió a *Ancylostoma duodenale* y 2 a *Necator americanus*. Los hallazgos del cultivo para uncinarias permanecieron negativos.

**Figura 5.** Prevalencia de uncinarias por medio de 2 placas de Kato-katz , concentrado, cultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 158 muestras de heces.



Para la identificación de *Strongyloides stercoralis* 197 muestras completaron los criterios de inclusión de las cuales el PCR en tiempo real detectó 8 (4.1%) muestras que las clasificó como positivas siendo superior a las demás técnicas microscópicas, inclusive al cultivo quien clasificó como positivas a 4 (2%) muestras, test de McNemar  $p > 0.05$ . Tanto el Kato-Katz como el concentrado de dos muestras no lograron identificar larvas. Figura 6.

**Figura 6.** Prevalencia de *Strongyloides Stercoralis* determinada por concentrado, cultivo y PCR en tiempo real (RT-PCR) en 197 muestras.



## 6.2 Sensibilidad y especificidad del RT- PCR

La sensibilidad obtenida por medio del PCR en tiempo real para los 4 parásitos *G. intestinalis*, *A. lumbricoides*, uncinarias y *S. stercoralis*, oscila del 25% al 55.5%, sin embargo la especificidad supera en todos los parásitos el 94% cuando se lo compara con los “gold

estándar” establecidos en el estudio; para *Giardia intestinalis*: concentrado + fresco, *Ascaris lumbricoides*: Kato-Katz + concentrado, Uncinarias: Kato-Katz + concentrado + cultivo y *Strongyloides stercoralis* concentrado + cultivo. De manera similar el índice de correlación Kappa para cada parásito son de características débiles excepto para *Ascaris lumbricoides* que es de correlación moderada.

**Tabla 4.** Eficiencia del RT-PCR frente a técnicas microscópicas en 4 parásitos intestinales

PARÁSITO	PCR EN TIEMPO REAL						Kappa
	S (%)	E (%)	VP + (%)	VP – (%)	RV+	RV-	
	IC.95%	IC.95%	IC.95%	IC.95%	IC.95%	IC.95%	
<i>Giardia intestinalis</i>	25 (18,2-31,8)	95,9 (93-99)	24 (19-32)	96 (92-99)	6.09 (1,4-25,8)	0.78 (0,52-1,6)	0,2
<i>A. lumbricoides</i>	65 (57.9-72.1)	98,4 (96,5-100)	92 (85-100)	90 (85-94)	43 (10,7-174,2)	0.35 (0,23-0,54)	0,54
Uncinarias	25 (18,3-31,7)	98 (96,1-99,9)	11 (9-13)	98 (96-100)	19,2 (2,1-171,2)	0.76 (0,43-1,33)	0,2
<i>S. stercoralis</i>	25 (19-31)	96 (93,3-98,7)	14 (11-17)	98 (96-100)	6.8 (1,08- 43,6)	0.78 (0,44-1,37)	0,3

S: sensibilidad, E: especificidad, VP+: valor predictivo positivo, VP-: Valor predictivo negativo, RV+ Razón de Verosimilitud positiva, RV-: Razón de Verosimilitud negativa, IC: intervalo de confianza al 95%



## 7. Discusión de resultados

Técnicas moleculares como el PCR en tiempo real para el diagnóstico de parásitos intestinales ha sido ensayado en estudios previos (31, 33, 61, 72, 73), sin embargo no se ha reportado su utilidad en estudios de campo en áreas con una baja carga parasitaria y especialmente en el Ecuador.

La prevalencia encontrada del 1,3% por medio del RT-PCR para *Entamoeba histolytica* es similar a los hallazgos reportados anteriormente en Ecuador por un estudio determinado por medio del cultivo y análisis de zimodemos (30), sugiriendo que en nuestro estudio el 24.3% de lo observado por microscopía podrían corresponder a *E. dispar*/ *E. moshkovskii*. De ser así, se podría inferir que con los métodos microscópicos hay alta probabilidad de error diagnóstico y tratamiento innecesario de las personas infectadas por protozoarios comensales. En cuanto a *Giardia intestinalis* se encontró una prevalencia mayor con el RT-PCR frente al análisis microscópico directo y concentrado, pero el número de muestras positivas fueron similares al RT-PCR cuando éstas se combinaron.

El RT-PCR detectó 4% de muestras positivas para *Strongyloides stercoralis* frente al 2% detectada únicamente por medio del cultivo, mientras que el concentrado y Kato-Katz no fueron capaces de identificarlo, éstos resultados son similares a los observados por Steinmann et. al. donde no encontró larvas de *S. stercoralis* por Kato-Katz o concentrado por formol-eter (75), confirmando que no son las técnicas ideales para su identificación. Se convierte en el primer reporte de *S. stercoralis* por medio del cultivo y PCR en el Ecuador. Tanto para *Ascaris*

*lumbricoides* como para uncinarias el RT-PCR fue inferior para clasificar como muestras positivas frente a las técnicas microscópicas combinadas, además que no se observó desarrollo de uncinarias en el cultivo pero si se observó huevos en el Kato-Katz y concentrado, esto podría deberse a factores como el retardo en la siembra ya que los huevos de uncinarias son lábiles al ambiente y debe analizarse lo antes posible (59-60). Adicionalmente, la capacidad de discriminación entre especies fue una de las ventajas del RT-PCR como lo demuestra el hallazgo de 2 pacientes con *Necator americano* y 1 con *Ancylostoma duodenal* convirtiéndose en el primer reporte de una diferenciación de género en Ecuador.

En cuanto a la sensibilidad del RT-PCR en todos los parásitos investigados se encontró un número elevado de resultados falsos negativos; para *G. intestinalis* se encontró una sensibilidad del 25%, esto concuerda con el estudio realizado por Schuurman et al. en el cual reportó que el RT-PCR es inferior en cuanto a sensibilidad y especificidad, aunque no en la misma magnitud, cuando se lo compara con técnicas microscópicas en fresco y concentrado con formol-eter (76) sin embargo otros estudios demuestran lo contrario y el RT-PCR es superior a las técnicas microscópicas (51-52). Los valores de sensibilidad encontrados para HTS, *A. lumbricoides*, uncinarias y *S. stercoralis*, son del 65%, 25% y 25% respectivamente, igualmente se encuentra un número elevado de resultados falsos negativos, estudios en los cuales se evalúa el RT-PCR para diagnóstico de *S. stercoralis* y RT-PCR multiplex para HTS han mostrado ser más sensibles y específicos que las técnicas microscópicas, Kato-Katz y el concentrado (61-63), sin embargo una razón para estos resultados de superioridad podría ser el empleo de muestras de personas procedentes de áreas endémicas y con alta carga parasitaria que contrasta con nuestro estudio que es en un área de baja carga parasitaria; se ha demostrado que la carga parasitaria influye en el rendimiento de los pruebas diagnósticas en especial los

microscópicos (60) ya que los huevos, larvas o quistes no siempre están presentes en heces, en base a esto Goddard propuso su teoría hasta hoy no descartada, en la cual establece que la intensidad de la infección incrementa con la prevalencia y la probabilidad de encontrar huevos, larvas o quistes depende de la carga parasitaria, por lo tanto la sensibilidad de una prueba diagnóstica es proporcional a la prevalencia de la infección parasitaria (82), al momento no se han reportado estudios sobre la utilidad del RT-PCR en poblaciones de baja prevalencia o en sitios donde la desparasitación es de manera periódica y que identifiquen los factores que afectan su rendimiento, por lo tanto podríamos considerar que varios factores podrían intervenir para encontrar resultados falsos negativos por el RT-PCR en nuestro estudio como es 1) un patrón de eliminación intermitente de huevos, larvas, trofozoitos o quistes como se observa en *S. stercoralis*, *A. lumbricoides*, uncinaria y *G. intestinalis* (44-46,81), 2) el número de formas parasitarias presentes en las heces por ejemplo, Oliveira y col. reportaron que en personas con una carga parasitaria de menor a 10 huevos por gramo de heces el PCR no fue capaz de determinar la presencia de *Schistosoma mansoni* en un área de baja prevalencia (83) y 3) otros factores como la presencia de inhibidores de la PCR, se sabe que en heces existe una variedad de sustancias capaces de inhibir las reacciones de PCR como los productos de descomposición de hem, como la bilirrubina y sales biliares, a demás de complejos de polisacáridos bacterianos (78), para superar estos inconvenientes se ha implementado protocolos para disminuirlos como la utilización de kits de extracción basados en filtros y columnas (spin columns) que han demostrado una alternativa para obtener buenas cantidades de ADN (79) y con bajos niveles de sustancias inhibitorias (80), en nuestro estudio se utilizó el FastDNA® SPIN Kit for Soil que utiliza partículas de silica y cerámica junto con filtros SPIN para la extracción de ADN, lo que podría haber asegurado una buena calidad,

cantidad de ADN y bajo contenido de inhibidores, sin embargo una debilidad fue el no emplear un control de inhibición para cada placa de reacción de PCR que hubiera permitido identificar la presencia de inhibidores (78).

La especificidad del RT-PCR supera el 96%, el VP- se encuentra por encima del 90% y RV+ que superan las 6 veces más, lo ubican al RT PCR como una prueba confirmatoria, en áreas como la de nuestro estudio donde no existe una prevalencia alta de los 5 parásitos investigados, ya sea por mejores condiciones sanitarias o por la desparasitación periódica, por lo tanto se podría recomendar que ante una alta sospecha de enfermedad y que no se obtenga resultados positivos por microscopía el siguiente paso sería recurrir a técnicas moleculares como el RT-PCR.

## **8. Conclusiones y Recomendaciones**

El PCR en tiempo real muestra muchas ventajas frente a otros test diagnósticos como los microscópicos que dependen de muchos factores para ser reproducibles, sin embargo la falta de estandarización en estudios de campo es un inconveniente que se presenta al querer introducirlo como test que puede superar a los establecidos como pruebas de oro, su baja sensibilidad en este estudio lo califica como un test no apto para tamizaje en pacientes con baja intensidad de infección, pero si para confirmarlas y útil en los casos de infecciones por *E. histolytica*. La falta de un control interno para la identificación de inhibidores de PCR estudios de campo. Se recomienda que para futuros estudios de ésta técnica se debiera emplear controles de inhibición que ayudarían a verificar si existen o no en las muestras de ADN provenientes de Heces.

## 9. Referencias

1. Cox G. *History of Human Parasitology*. Clinical Microbiology Reviews 2002;15: 595–612
2. Calogero S. et al. *Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: preliminary data*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003;98:161-163
3. Hoberg et al. Out of Africa: origins of the *Taenia* tapeworms in humans. Proc R. Soc. London. 2001; 208: 781-787
4. World Health Organization. *Informe sobre la Evaluación Mundial el Abastecimiento de Agua y el Saneamiento en 2000*. WHO 2000
5. World Health Organization *The world health association life in the 21st century a vision for all*. Geneva. WHO 1998
6. Betohony J, et al. *Soil-transmitted helminth infections: Ascariidiasis, trichuriasis and hookworm*. Lancet 2006;367:1521-1532
7. William S, et al. *Entamoeba histolytica: an update*. Current opinion in infectious diseases 2003;16:479-485
8. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. Geneva, 1997;72:97-100
9. Fotedar et al. *A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt 1995*. J Eukaryot Microbiol. 1993;40:340-344.
10. David Botero y Marcos Restrepo. *Parasitosis humanas, cuarta edición*, Medellin Colombia. Editorial para investigaciones biológicas (CIB). 2004

11. Shahram S. et al. *Intestinal invasion by Entamoeba histolytica*. Subcell Biochem 2008;47:221–232
12. Leippe M et al. *Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1993;59:101–109
13. Gathiram et al. *A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of Entamoeba histolytica*. S. Afr. Med. J. 1997;72:669–672
14. Haque R. *Amebiasis*. N Engl J Med, 2003;348:1565-157
15. Parija et al. *Entamoeba moshkovskii and Entamoeba dispar-associated infections in Pondicherry, India*. J. Health Pop. Nutr. 2005;23:292–295
16. Haque et al. *A case report of Entamoeba moshkovskii infection in a Bangladeshi child*. Parasitol. Int. 1998;47:201–202
17. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO *report of consultation of experts on amoebiasis*. Wkly Epidemiol Rec 1997;72:97-99
18. Jacobsen et al. *Prevalence of Intestinal Parasites in Young Quichua Children in the Highlands of Rural Ecuador*. J. Health Pop. Nutr 2007;25:399-405
19. Gatti S. et al. *Amebic infections due to the Entamoeba histolytica–entamoeba dispar complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador*. Am. J. Trop. Med. Hyg 2002;67:123–127
20. Fotedar R. *Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species*. Clinical Microbiology Reviews 2007;20:511–532
21. Pillai et al. *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: Epidemiology and Comparison of Diagnostic Methods in a Setting of Nonendemicity*. Clinical Infectious Diseases 1999;29:1315–8

22. Lauren D. *Distinguishing Between Pathogenic and Non-Pathogenic Species of Entamoeba*. Labmedicine 2004;35:613-615
23. Hira P. et al. *Invasive amebiasis: challenges in diagnosis in a non-endemic country (Kuwait)*. Am. J. Trop. Med. Hyg 2001;65:341–345
24. Haque et al. *Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection*. J. Clin. Microbiol 1998 36:449–452
25. Stark D. et al. *CELISA PATH y TechLab E. histolytica II) . Comparison of Stool Antigen Detection Kits to PCR for Diagnosis of Amebiasis*. Journal of clinical microbiology 2008;46:1678–1681
26. Katzwinkel S. et al. *Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica DNA from stool specimens*. Am. J. Trop. Med. Hyg 1994;51:15-1 18
27. Nuñez Yo et al. *Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of Entamoeba histolytica and entamoeba dispar DNA from stool samples*. A. Med. J. Trop. Hyg 2001;64:293-297,
28. Khairnar K. et al. *A novel nested multiplex PCR assay for differential detection of entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and entamoeba moshkovskii in stool samples*. BMC microbiology 2007;7:47
29. Blessmann J. et al. *Real-Time PCR for Detection and Differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in Fecal Samples*. Journal of Clinical Microbiology 2002;49:4413–4417
30. Fotedar R. *Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species*. Clinical Microbiology Reviews 2007;20:511–532

31. Hamzah Z. et al. *Development of Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii in Clinical Specimens.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010; 83:909–913
32. Qvarnstrom Y. et al. *Comparison of Real-Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis.* Journal of Clinical Microbiology 2005;43:5491–5497
33. Taniuchi M. et al. *High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites.* Am. J. Trop. Med. Hyg 2011;84:332-337
34. Rinne S. et al. *Prevalence and risk factors for protozoan and nematode infections among children in an Ecuadorian highland community.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2005;99:585-592
35. SY Cho et al. *Status of intestinal parasite infections in inhabitants of Palmar, Guayas Province, Ecuador.* Korean J Parasitol 1990;28:109-113
36. Syed A. et al. *Giardia intestinalis.* Curr Opin Infect Dis 2003;16:453–460
37. Sackey M. et al. *Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children.* J Trop Pediatr 2003;49:17-23
38. Simsek Z. et al. *Effect of Giardia infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years.* J. Trop. Pediatr. 2004:90-93
39. Buret A. *Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis.* Gut 2007;56:316–317
40. Bertrand I. et al. *Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of Giardia lamblia in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism.* Journal of clinical Microbiology, Dec. 2005;(43):5940–5944



41. *First genotyping of Giardia lamblia from human and animal feces in Argentina, South America.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008;103:98-103
42. Haque R. et al. *Giardia Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh Rash.* The Journal of Infectious Diseases 2005;192:2171-2173
43. Sahagún J. et al, *Correlation between the presence of symptoms and the Giardia duodenalis genotype.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2008; 27:81-83
44. Lopez M. *Numbers of Giardia in the feces of infected children.* Am J Trop Med Hyg. 1975;24:237-242,
45. Branda J. *A Rational Approach to the Stool Ova and Parasite Examination.* Clinical Infectious Diseases 2006;42:972-978
46. Cartwright Ch. *Utility of Multiple-Stool-Specimen Ova and Parasite Examinations in a High-Prevalence Setting.* Journal of Clinical Microbiology. 1999;37:2108-2411
47. Weitzel T. *Evaluation of seven commercial antigen detection tests for Giardia and Cryptosporidium in stool samples.* Clin. Microbiol. Infect. 2006;12:656–659.
48. Johnston S. et al. *Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of Giardia and Cryptosporidium Organisms in Fecal Specimens, Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41:623–626
49. Zimmerman S. et al. *Comparison of Conventional Stool Concentration and Preserved-Smear Methods with Merifluor Cryptosporidium/Giardia Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for Detection of Giardia lamblia.* Journal of Clinical Microbiology. 1995;33:1942–1943

50. Bertrand I. et al. *Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of Giardia lamblia in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* Journal of clinical microbiology 2005: 5940–5944
51. David E. et al. *Diagnosis of Giardia infection by PCR-based methods in children of an endemic area.* The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2011;17:209-215
52. Verweij J. et al. *Simultaneous Detection of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium parvum in Fecal Samples by Using Multiplex Real-time PCR.* Journal of Clinical Microbiology 2004;42:1220-1223
53. Haque R. et al. *Multiplex real-time PCR assay for detection of entamoeba histolytica, giardia intestinalis, and cryptosporidium spp.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007;76:713 – 717
54. Cooper P. et al. *Allergic Symptoms, Atopy, and Geohelminth Infections in a Rural Area of Ecuador.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003;168:313-317
55. Bethony J. *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm.* Lancet. 2006;6:1521-1532
56. Peter J. *Hookworm Infection* N Engl J Med 2004;19:799-807
57. Montresor A. *Guidelines for the evaluation of soil-transmitted helminthiasis and Schistosomiasis at community level .* WHO 1998
58. Tarafder M. *Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, Ascaris lumbricoides and Trichuris trichiura infections in humans in the absence of a 'gold standard'* International Journal for Parasitology 2010;40:399–404

59. Booth M. et al. *The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing Schistosoma mansoni and hookworm co-infections in rural Côte d'Ivoire*. Parasitology. 2003;127:525-531
60. Knopp S. *Diagnosis of Soil-Transmitted Helminths in the Era of Preventive Chemotherapy: Effect of Multiple Stool Sampling and Use of Different Diagnostic Techniques*. PLoS neglected of tropical diseases 2008;2:331-335
61. Basuni M. *A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths* Am. J. Trop. Med. Hyg., 2011;84:338–343
62. Johanna. *Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of Ancylostoma duodenale and Necator americanus infections in humans in northern Ghana* Tropical Medicine and International Health 2005;10:574–580
63. Siddiq A. *Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection*. Clinical Infectious Diseases 2001;33:1040-1044
64. Olsen A. *Strongyloidiasis — the most neglected of the neglected tropical diseases?* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2009;103:967-972
65. Montes M. *Strongyloides stercoralis: there but not seen*. Curr Opin Infect Dis. 2010 ;23:500–504
66. Kaminsky RG et al. *Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of Strongyloides stercoralis infection*. J Parasitol. 1993;79:277-80
67. Salazar SA et al. *Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995;23:141-145

68. Inês Ede J et al. *Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of Strongyloides stercoralis and hookworm in faecal specimens*. Acta Trop. 2011 ;120:206-210
69. Glinz D. *Comparing Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for Schistosoma mansoni and Soil-Transmitted Helminths*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e754
70. Uparanukraw P. et al. *Fluctuations of larval excretion in strongyloides stercoralis infection*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999;60:967–973
71. Nielsen PB. *Improved diagnosis of strongyloides stercoralis by seven consecutive stool specimens*. Parasitology 1987;263:616-618
72. Verweij J. *Molecular diagnosis of Strongyloides stercoralis in faecal samples using real-time PCR*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103:342-346.
73. Kramme S. *Novel real-time PCR for the universal detection of Strongyloides species*. J Med Microbiol. 2011;60:454-8
74. Heid C. et al *Real time quantitative PCR*. Genome Res. 1996;6:986-994
75. Steinmann et al. *Occurrence of Strongyloides stercoralis in Yunnan Province, China, and Comparison of Diagnostic Methods* PLoS Neglected Tropical Diseases 2007;1:6
76. Schuurman et al. *Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of Giardia lamblia in human stool specimens*. Clin Microbiol Infect. 2007 Dec;13(12):1186-91. Epub 2007 Oct 19.
77. Verweij et al. *Molecular diagnosis of Strongyloides stercoralis in faecal samples using real-time PCR*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:378-382
78. Hoorfar et al.. *Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays*. J Clin Microbiol. 2004;42:1863-1868

79. Ariefdjohan R. et al. *Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens.* Nutrition Journal 2010;22:9:23
80. Alexandra L. et al. *A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples.* Journal of Microbiological Methods 2002;50:131–139
81. Dreyer et al. *Patterns of Detection of Strongyloides stercoralis in Stool Specimens: Implications for Diagnosis and Clinical Trials* Journal of clinical microbiology: 1996;34:2569–2571
82. SJ de Vlas et al. *Review papers : Statistical models for estimating prevalence and incidence of parasitic* Stat Methods Med Res 1993; 2: 3-21
83. Oliveira et al. *Evaluation of polymerase chainreaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity Schistosoma mansoni infection.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease: 2010;68:416–421

## 12.ANEXO A

**Tabla5: representación de la posición de cada muestra en los pocillos de la placa del RT-PCR**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STANDARD 1			STANDARD 2			STANDARD 3			STANDARD 4		
B	STANDARD 5			STANDARD 6			STANDARD 7			NEGATIVE CONTROL		
C												
D	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
E												
F	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24
G												
H	Sample 25	Sample 26	Sample 27	Sample 28	Sample 29	Sample 30	Sample 31	Sample 32	Sample 33	Sample 34	Sample 35	Sample 36

## ANEXO B

Tabla 6: Tabla cruzada para *Ascaris lumbricoides*.

Prueba	<b>Kato-Katz + concentrado</b>		
<b>RT-PCR</b>	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	26	2	28
Negativo	14	131	145
<b>Total</b>	40	133	<b>173</b>

Tabla7: Tabla cruzada para *Giardia intestinalis*

Prueba	<b>Fresco + concentrado</b>		
<b>RT-PCR</b>	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	2	6	8
Negativo	6	142	148
<b>total</b>	8	148	<b>156</b>

Tabla 8: Tabla cruzada para Uncinarias

Prueba	<b>Kato-Katz + concentrado + cultivo</b>		
<b>RT-PCR</b>	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	1	2	3
Negativo	3	152	155
<b>Total</b>	4	154	<b>158</b>

Tabla 9: Tabla cruzada para *Strongyloides stercoralis*

Prueba	<b>Concentrado + cultivo</b>		
<b>RT-PCR</b>	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	1	7	8
Negativo	3	186	189
<b>Total</b>	4	193	<b>197</b>