UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

Comparación de resultados por microscopía vs. qPCR y caracterización molecular de parásitos intestinales en menores de 15 años de una comunidad indígena del Amazonas (Colombia)

Angie Johanna Sánchez Castro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública
Bogotá, Colombia
2017

Comparación de resultados por microscopía vs. qPCR y caracterización molecular de parásitos intestinales en menores de 15 años de una comunidad indígena del Amazonas (Colombia)

Angie Johanna Sánchez Castro

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Infecciones y Salud en el Trópico

Director (a):

Myriam Consuelo López Páez, B. Msc.

Codirector (a):

Juan David Ramírez González, PhD.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública

Bogotá, Colombia

2017

“Todos los hombres deben tropezar con frecuencia para llegar a la verdad”

Og Mandino

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a las comunidades indígenas que participaron en el estudio, a los niños del departamento del Amazonas Colombia, pertenecientes a los corregimientos de Puerto Nariño, San Juan del Soco, Villa Andrea y Nuevo Paraíso.

Agradezco a las entidades que colaboraron con el desarrollo del proyecto:
Universidad Nacional de Colombia, a la Maestría en Infecciones y salud en el Trópico
Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia
Grupo de investigaciones Microbiológicas GIMUR, Universidad del Rosario

Agradezco de manera especial a mis directores Myriam Consuelo López y Juan David Ramírez por su colaboración, apoyo incondicional, por el tiempo dedicado de principio a fin, a la guía y enseñanzas que me dejan a lo largo del desarrollo de este proyecto; gracias a ustedes, el crecimiento profesional y como persona que he adquirido con cada paso que se dio con este trabajo, que más que un trabajo me deja llena de experiencias personales que enriquecen mi vida y serán herramientas valiosas para continuar en este camino.

Agradecimientos especiales a la Profesora Patricia Reyes, docente Facultad de Medicina, Laboratorio de Parasitología Universidad Nacional de Colombia, Dora Ríos y Amparito, laboratorio de Microbiología de la Universidad del Rosario.
A mis compañeros y amigos que se cruzaron en este tiempo, de los cuáles aprendí y me apoyaron siempre Cielo León, Lina Barrera, Marcela Parra, Marina Muñoz, Carlos Murcia.
A los incondicionales, Constanza Barrantes, Javier Pérez, Paola Torres, Lorenza García, Daniel Sánchez.

Por último, a los Jurados, por el tiempo que tomaron y su colaboración para leer y evaluar este trabajo

Resumen

Las infecciones por parásitos intestinales tienen amplia distribución y elevada frecuencia en algunas regiones afectando individuos de toda edad y género. En países en desarrollo, están relacionadas a factores económicos y sociales, condicionados por características geográficas y ecológicas; su incidencia en niños es común, debido a las diferencias en comportamientos y hábitos. Tanto protozoos como geohelmintos son frecuentes en diferente proporción en algunas poblaciones; personas que viven en áreas tropicales como el Amazonas (poblaciones indígenas) tienen regular calidad de vida, favoreciendo las infecciones de transmisión fecal-oral. El objetivo de este trabajo fue identificar la frecuencia de parásitos intestinales mediante PCR en tiempo real (qPCR), comparar los resultados obtenidos con q PCR, examen directo y Kato katz con el fin de conocer el porcentaje de positividad obtenido con cada técnica; y describir las subpoblaciones parasitarias presentes en cuatro comunidades indígenas del Amazonas. Se analizaron 261 muestras de niños menores de 15 años; se observó alta frecuencia de infección por qPCR de *Blastocystis* sp 89,7% (n=234), seguido por *Giardia duodenalis* 65,9% (n=172), *Entamoeba histolytica* 7,3% (n=19), los helmintos el más frecuente *Ascaris lumbricoides* 52,3% (n=138) y *Trichuris trichiura* 48,7% (n= 127), *Ancylostoma duodenale* 5% (n=13) y *Necator americanus* 51% (n=133). Para los genotipos, *G. duodenalis* con el marcador (*gdh*) se ecnontraron ensamblajes AI, BIII y BIV, con (*tpi*) ensambles AI, AII, BIII y BIV. Los subtipos (STs) de *Blastocystis* sp. fueron 1, 2, 3, 4 y 6; y finalmente, se identificaron para *Cryptosporidium* sp las especies *C. viatorum, C. hominis y C. parvum*. Se observó un alto perfil de transmisión zoonótica en relación con los ensamblajes de *G. duodenalis* y STs / alelos *Blastocystis* sp. También una elevada frecuencia de infección, lo que sugiere una transmisión activa en el área. Esto refuerza la necesidad de implementar mejores sistemas de vigilancia epidemiológica para patógenos entéricos, que aportan información para conocer el potencial zoonótico e identificar las comunidades en riesgo, con el fin de mejorar las medidas de control.

Palabras clave: Parásitos, zoonosis, protozoos, helmintos, indígenas, epidemiología molecular.

Abstract

Intestinal parasite infections have wide distribution and high frequency in some regions affecting individuals of all ages and gender. In developing countries, they are related to economic and social factors, conditioned by geographical and ecological characteristics; Its incidence in children is common, due to differences in behaviors and habits. Both protozoa and geohelminths are frequent in different proportions in some populations; People living in tropical areas such as the Amazon (indigenous populations) have a regular quality of life, favoring fecal-oral transmission infections. The objective of this work was to identify the frequency of intestinal parasites by real-time PCR (qPCR), compare the results obtained with q PCR, direct examination and Kato katz in order to know the percentage of positivity obtained with each technique; And describe the parasitic subpopulations present in four indigenous communities of the Amazon. We analyzed 261 samples of children younger than 15 years; (N = 234), followed by Giardia duodenalis 65.9% (n = 172), Entamoeba histolytica 7.3% (n = 19), helminths More frequent Ascaris lumbricoides 52.3% (n = 138) and Trichuris trichiura 48.7% (n = 127), Ancylostoma duodenale 5% (n = 13) and Necator americanus 51% (n = 133). For the genotypes, G. duodenalis with the marker (gdh) AI, BIII and BIV assemblies were isolated with (tpi) assemblies AI, AII, BIII and BIV. The subtypes (STs) of Blastocystis sp. Were 1, 2, 3, 4 and 6; And finally, C. viatorum, C. hominis and C. parvum were identified for Cryptosporidium sp. A high zoonotic transmission profile was observed in relation to the assemblages of G. duodenalis and STs / alleles Blastocystis sp. Also a high frequency of infection, suggesting an active transmission in the area. This reinforces the need to implement better epidemiological surveillance systems for enteric pathogens, which provide information to know zoonotic potential and identify communities at risk, in order to improve control measures.

Key words: Parasites, zoonoses, protozoa, helminths, indigenous, molecular epidemiology.

Contenido

Pág.

Contenido

Resumen ..... **VII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XIII**
Símbolos con letras griegas XIII
Abreviaturas XIII

1. Capítulo 1: Parásitos Intestinales **5**
1.1 Protozoos 5
1.1.1. Complejo E. histolytica/E. dispar/E.moshckovskii 6
1.1.2 Giardia duodenalis 7
1.1.3 Cryptosporidium spp 8
1.1.4 Blastocystis sp 10
1.2 Geohelmintos 11
1.2.1 Ascaris lumbricoides 13
1.2.2 Trichiuris trichiura 13
1.2.3 Uncinarias: Ancylostoma duodenale y Necator americanus 14

2. Capítulo 2 Herramientas moleculares empleadas para la identificación de parásitos intestinales **16**
2.1 Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) 17
2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional 18
2.3 Amplificación isotérmica mediada por Loop (LAMP) 18
2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) 19

3. Capítulo 3: Comunidades Indígenas. Amazonas-Colombia **20**
3.1 Características biogeográficas 21
3.1.1 Demografía 21
3.2 Características socio-económicas 21
3.3 Composición étnica 22
3.4 Condiciones de vida 23
3.5 Legislación 24

4. Capítulo 4: Antecedentes **26**

5. Capítulo 5: Planteamiento del problema **31**
5.1 Pregunta de investigación 31
5.2 Objetivos 31
5.2.1 Objetivo general 31
5.2.2 Objetivos específicos 31

6. Capítulo 6: Marco metodológico **32**
6.1 Tipo de Estudio 32
6.2 Consideraciones éticas 32
6.3 Población de estudio 33
6.4 Recolección y conservación de las muestras 33
6.5 Procesamiento de las muestras 34

6.5.1 Extracción de ADN 34
6.5.2 Detección Molecular de G. duodenalis, E. histolytica, Cryptosporidium spp, Blastocystis sp, A. duodenale, N. americanus, T. trichiura, A. lumbricoides, mediante q PCR37
6.5.3 Detección molecular de E. dispar y E. moshkovskii mediante PCR convencional 40
6.6 Caracterización molecular 41
6.6.1 PCR blanco molecular GDH y TPI para Giardia duodenalis 41
6.6.2 PCR para la caracterización molecular de Blastocystis con el marcador 18s .. 42
6.6.3 Análisis y secuenciación 43
6.7 Índices de diversidad genética 44
6.8 Análisis estadístico 44

7. Capítulo 7: Resultados 46
7.1 Resultados Objetivo 1 46
7.1.1 Frecuencia de parásitos intestinales 46
7.2 Resultados Objetivo 2 (análisis de concordancia entre microscopía vs. qPCR) 50
7.3 Resultados Objetivo 3 (genotipificación) 50
7.3.1 Frecuencia de la infección por G. duodenalis 50
7.3.2 Asociaciones entre variables sociodemográficas y conjuntos de G. duodenalis 51
7.3.3 Frecuencia de la infección por Blastocystis, STs y alelos 51
7.3.4 Asociaciones entre variables sociodemográficas, STs y alelos de Blastocystis sp 52
7.3.5 Frecuencia de Cryptosporidium sp, especies y subtipos 52
7.3.6 Índices de diversidad genética en Giardia y Blastocystis 58
7.3.7 Infecciones mixtas en Giardia y Blastocystis 61

8. Discusión 62

9. Conclusiones y recomendaciones 70
9.1 Conclusiones 70
9.2 Recomendaciones 71

Bibliografía 73

Lista de figuras

Pág.

Figura 1 Ubicación geográfica de las comunidades indígenas participantes en el estudio 33
Figura 2 Huevos de Trichuris después de realizar la primera fase de lisis (protocolo de extracción)..... 47
Figura 3 Análisis de concordancia e índice Kappa entre las técnicas empleadas para la identificación de parásitos intestinales..... 49
Figura 4 Frecuencia y distribución de ensamblajes de Giardia para cada una de las comunidades estudiadas. 54
Figura 5 Frecuencia y distribución de STs y alelos de Blastocystis encontrados por cada comunidad del estudio..... 55
Figura 6 Infecciones mixtas entre subtipos de Blastocystis sp y ensamblajes de G.duodenalis 61

.

Lista de tablas

Pág.
Tabla 1 Clasificación de la intensidad de infección por helmintos (huevos de helmintos) 12
Tabla 2 Pruebas moleculares empeladas para la identificación de Parásitos Intestinales 17
Tabla 3 Secuencia de primers empleados para la identificación de parásitos intestinales por qPCR 37
Tabla 4. Secuencia de sondas empleadas para la identificación de parásitos intestinales por qPCR 37
Tabla 5 Lista de controles empleados para la identificación de parásitos intestinales en qPCR 38
Tabla 6. Preparación de pre mezcla para qPCR 39
Tabla 7 Perfil térmico empleado para qPCR 39
Tabla 8 Mezcla para PCR Entamoba dispar y Entamoeba moshkovskii 40
Tabla 9 Secuencia de Primers empleados para la PCR de Entamoebas 40
Tabla 10 Perfil térmico para la PCR de Entamoebas 40
Tabla 11. Marcadores moleculares para la identificación de parásitos intestinales 41
Tabla 12 Mezcla para PCR para la caracterización molecular de Giardia duodenalis 42
Tabla 13 Perfil térmico, primera y segunda parte PCR para la caracterización molecular de Giardia duodenalis con el marcador (gdh) 42
Tabla 14 Perfil térmico, primera y segunda parte PCR para la caracterización molecular de Giardia duodenalis con el marcador (tpi) 42
Tabla 15 Mezcla para PCR blanco molecular 18s para Blastocystis 43
Tabla 16 Perfil térmico para PCR blanco 18s para Blastocystis sp 43
Tabla 17 Frecuencia total de helmintos y protozoos intestinales entre 261 participantes de cuatro municipios de Colombia después de tamizar las muestras con examen directo y PCR, estratificadas por género y grupo de edad. 48
Tabla 18 Frecuencia de infecciones por helmintos y protozoos intestinales en 4 municipios de Colombia de acuerdo al examen directo y PCR 48
Tabla 20 Frecuencia de infección, ensamblajes de Giardia, STs de Blastocystis sp 56
Tabla 21 Asociación entre frecuencia de infección, edad, género y comunidad entre los individuos incluidos en el estudio. 57
Tabla 22 Índices de diversidad genética de tpi y gdh para G. duodenalis y 18S rDNA para Blastocystis sp a través de las comunidades muestreadas en el estudio 59

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
β	Beta
Y	Intercepto Y
κ	Índice kappa
θ	Thetha
π	Pi

Abreviaturas

Abreviatura	*Término*
ADN	Ácido Desoxiribonucléico
NA	No aplica
NC	No coincide
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real
tpi	Triosa fosfato isomersasa
gdh	Glutamato deshidrogenasa
STs	Sub tipos

Introducción

El parasitismo intestinal, afecta de manera desproporcionada a comunidades marginadas, de bajos recursos en el mundo; se estima que más de mil millones de personas en las regiones en desarrollo como áreas de África subsahariana, Asia y América están infectados con una o más especies de helmintos [1]. Adicionalmente, cientos de millones de personas en países en desarrollo corren el riesgo de desarrollar enfermedades parasitarias como las geo helmintiasis, siendo consideradas como enfermedades tropicales desatendidas (NTD) [2].

En infecciones por protozoarios, se encuentran relacionados con diarrea en los países desarrollados y en desarrollo [3]. La carga mundial de estas infecciones estimó que la amebiasis estaba asociada con más de 55.000 muertes y 2,2 millones de discapacidades ajustadas por años de vida "años de vida potencialmente perdidos por discapacidad" (DALY) y que la criptosporidiosis con más de 99.000 muertes y 8.3 millones de "años de vida ajustados por discapacidad" (AVAD) [4]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en años anteriores, la frecuencia de 3500 millones de personas infectadas por parásitos y de ellos aproximadamente 450 millones padecían enfermedad parasitaria, de éstos la mayor proporción correspondía a la población infantil; por otra parte, también reporta que aproximadamente 1500 millones de personas 24% de la población mundial está infectada por geohelmintos; a su vez, la OPS estima que la prevalencia de geohelmintiasis en los países de América Latina y el Caribe es mayor del 20% y esta proporción puede llegar hasta el 90% en las zonas con más bajos recursos [5, 6].

En el transcurso del tiempo, se ha determinado que estas infecciones se asocian a factores como pobreza, inadecuada sanidad ambiental y precarios e improvisados servicios de salud siendo entonces, considerados el principal problema de salud pública para algunos países en vía de desarrollo [7]. Al igual, los países tropicales, como es el caso de Colombia

país en desarrollo, las enfermedades infecciosas –incluidas las producidas por parásitos– siguen presentando prevalencias elevadas [8]; los factores asociados a estas infecciones son por lo general la contaminación fecal del suelo y los alimentos, la insuficiencia de agua potable, la utilización de aguas residuales, la ausencia de saneamiento ambiental y las condiciones socioeconómicas vulnerables. Es así, que la prevalencia de las infecciones por parásitos intestinales en poblaciones con éstas características se mantiene, generando un riesgo para la dinámica de transmisión entre sus habitantes siendo un problema de salud pública en el país [9].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta entonces, la voluntad de controlar las enfermedades tropicales desatendidas, impulsando el objetivo de eliminar o reducir su impacto en las poblaciones a riesgo [10] apoyando el desarrollo de nuevas estrategias que permitan mejorar el diagnóstico asertivo y oportuno en diferentes poblaciones (WHO) [11], como aquellas consideradas vulnerables las cuales enmarcan tanto población infantil como las comunidades indígenas; un ejemplo de la alta frecuencia de parásitos intestinales observadas en diferentes estudios realizados en pueblos indígenas en Brasil, como Xavante, Hüpda, Kaingáng, Maxakali, Terena y otros grupos étnicos en la Amazonia, describen una frecuencia de *Ascaris lumbricoides* y Ancylostomas elevada en la población entre el 45 y 95%, y los protozoos como *G. duodenalis* y Complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* son también frecuentes en diferentes pueblos indígenas de la Amazonía Brasilera [12]. El proceso de expansión económica más el deterioro significativo de la salud por las condiciones desfavorables de éstas comunidades, hace frecuente la presencia de enfermedades parasitarias [13].

El diagnóstico de infecciones parasitarias intestinales se realiza tradicionalmente usando técnicas convencionales basadas en la microscopía, las cuales tienen la ventaja de ser asequible para realizarse en escenarios de recursos limitados; sin embargo, su uso tiene algunos inconvenientes, uno de los cuales es el tiempo oportuno de procesamiento puesto que por ejemplo, algunos parásitos protozoarios, tienden a deteriorarse rápidamente fuera del huésped, lo que significa que se encuentran sólo en aquellas muestras que son examinadas inmediatamente después de la recolección [14]. Estudios comparativos indican que, para el diagnóstico fiable de las infecciones intestinales protozoarias, se recomienda el muestreo múltiple para mejorar la calidad diagnóstica [15]; adicionalmente para mitigar el riesgo de sub diagnóstico, se recomienda la implementación de muestras

seriadas de materia fecal para mejorar la sensibilidad de detección [16, 17]. Con lo anterior se suma que, con el uso de técnicas convencionales, no se puede realizar un diagnóstico diferencial entre especies patógenas y no patógenas de algunos parásitos intestinales morfológicamente idénticos como es el caso del complejo Entamoeba (E*. histolytica/E. dispar/E.moshkovskii*). Debido a esto, se propone la implementación de técnicas moleculares las cuales permitan generar un diagnóstico sobre las especies y subpoblaciones circulantes de estos parásitos intestinales en poblaciones vulnerables con el fin de conocer su potencial zoonótico e identificar las zonas en riesgo donde se puedan desarrollar o mantener las posibles infecciones [18].

El uso de la tecnología de PCR tiempo real es una de las alternativas que brinda la identificación de ADN parasitario a partir de muestras de materia fecal conservadas previamente una vez colectadas. Aunque su uso en los países en desarrollo sigue siendo limitado [19], garantiza una sensibilidad comprendida entre el 80-100% para la identificación de ADN parasitario, esta sensibilidad está comprendida en la detección de bajas concentraciones de ADN parasitario las cuales con técnicas convencionales o de rutina pueden llegar a ser reportadas como falsos negativos [14].

En algunos pacientes, múltiples parásitos pueden ser responsables de diarrea persistente, por tal motivo se busca optimizar las técnicas de diagnóstico basadas en la identificación de ADN los cuales pueden aportar información que permita ayudar a comprender la dinámica de transmisión y conocer el potencial zoonótico de las diferentes especies parasitarias e identificar las comunidades en riesgo, con el fin de establecer medidas de control para la intervención de las infecciones parasitarias [20, 21].

Por consiguiente, basados en estudios puntuales en los cuales se han comparado las frecuencias obtenidas con técnicas convencionales como al microscopía frente a las técnicas moleculares; se ha reportado una diferencia entre los resultados siendo más frecuente encontrar un mayor porcentaje de positividad con aquellas técnicas basadas en la identificación de ADN parasitario, adicionalmente el poder realizar la identificación de poliparasitismo presente en una muestra re afirma la importancia de su aplicación para las ayudas diagnósticas en parasitismo intestinal [14, 22, 23]. Adicional a lo anterior, poder identificar varios agentes a partir de una única muestra biológica en poblaciones con prevalencias bajas que no son diagnosticadas por las técnicas convencionales, aumenta

las posibilidades de disminuir el sub diagnóstico, siendo de gran utilidad para los programas de control en estas poblaciones [11].

En Colombia, según la encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en población escolar para el año 2012-2014, se informaron los datos de frecuencias en protozoos de importancia clínica como: complejo *E. histolytica/E. dispar* con un 17%, *G. duodenalis* con 15,4%, *Cryptosporidium* spp 0,5% y *Blastocystis* sp con más de 5 parásitos por campo 5,6% y menos de 5 parásitos por campo 52,1% siendo este último el más frecuente en la población escolar a nivel nacional. En cuanto a los geohelmintos más frecuentes están *T. trichiura* con 18,4%, *A. lumbricoides* con 11,3% y Uncinarias spp con 6,4% [6].

Debido a las diferencias entre las capacidades operativas de las pruebas diagnósticas de parásitos intestinales (pruebas convencionales vs. Pruebas moleculares). En este proyecto se buscó realizar la comparación de los resultados obtenidos mediante microscopia y PCR en tiempo real para los parásitos intestinales: *E. histolytica, E. dispar, E. moshkovskii, G.duodenalis, Cryptosporidium* spp*, Blastocystis* sp*, A. lumbricoides, A. duodenale, N. americanus y T. trichiura*, siendo estos los parásitos más prevalentes en el país. Así mismo con el objetivo de conocer la presencia de algún genotipo o sub genotipo relacionado con infecciones en población humana, y que tengan algún potencial zoonótico; se realizó la caracterización molecular de *G. duodenalis, Cryptosporidium* spp *y Blastocystis* sp., en las muestras analizadas.

1. Capítulo 1: Parásitos Intestinales

1.1 Protozoos

Se conocen más de 15 géneros de protozoarios que parasitan al ser humano, algunos de éstos se consideran comensales naturales y se relacionan con infecciones intestinales [24]. Entre los protozoos más frecuentemente reportados se encuentran *G.duodenalis* *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* y *Cystoisospora* belli [6]. De acuerdo a lo anterior, se encuentran hospederos infectados que según su estado inmunológico y la especie del parasito, pueden ser portadores asintomáticos o sintomáticos, razón por la cual es importante determinar la especie de parásito para el posterior tratamiento para llegar a reducir su transmisión [24].

La identificación de estos protozoos se fundamenta en la observación y el reconocimiento de sus características morfológicas, que facilitan su identificación mediante exámenes directos y/o coloraciones, el uso de preparaciones simples en fresco a partir de muestras de materia fecal, en solución salina y lugol permite la visualización de algunas estructuras [8]. Adicionalmente se han desarrollado técnicas de concentración con el fin de poder optimizar las técnicas convencionales de microscopía, una de estas técnicas es: formol-éter, procedimiento más utilizado para la concentración de quistes de protozoos basada en el uso de una solución salina isotónica que por medio de la formación de capas permite la separación de las formas parasitarias con mayor facilidad [11]. Adicionalmente, en algunos casos se busca aumentar la probabilidad de recuperar las formas parasitarias mediante el uso de muestras de materia fecal seriadas las cuales van desde 3 a 5 muestras [6].

Para el diagnóstico de algunos protozoos como *Cryptosporidium* spp. intestinales se realiza una coloración específica llamada Ziehl Neelsen modificado, ya que estos ooquistes contienen ácidos micólicos en su pared que les permite tomar esta coloración,

la cual es analizada por microscopía donde se visualizan los ooquistes de estos parásitos [6].

1.1.1. Complejo *E. histolytica/E. dispar/E.moshckovskii*

La amebiasis es causada por protozoos del genero *Entamoeba*, del cual la especie *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la disentería amebiana y es la única considerada patógena entre *E. dispar* y *E. moshkovskii*, tiene la capacidad de penetrar la pared del intestino ocasionado daños a nivel tisular y otras patologías en órganos y tejidos extra intestinales [25].

En el mundo se estima que 50 millones de personas se encuentran infectadas con *E. histolytica* y 40.000 personas han presentado alguna sintomatología; adicionalmente a la presencia de *E. histolytica y E. dispar*, en los últimos años *E. moshkovskii* ha tomado gran importancia dada su capacidad de infectar a seres humanos, aunque se considera de vida libre y no es patógena, su presencia se ha visto relacionada con cuadros entéricos en presencia del complejo *E. histolytica/ E. dispar* [26]

El complejo es morfológicamente difícil de diferenciar, es así que se ve la necesidad de identificar el complejo *E. histolytica / E. dispar/E. moshkovskii* mediante otras técnicas diferentes a las basadas en la microscopía. Existen algunos métodos bioquímicos como la identificación de isoenzimas presentes en los trofozoítos, principalmente hexoquinasa y fosfoglucomutasa que permiten su diferenciación entre cada una de las tres especies pertenecientes al complejo. Otra es la electroforesis obteniendo un patrón de bandas que permiten igual su diferenciación, caracterizando diferentes patrones isoenzimáticos, llamados zimodemos, unos correspondientes a las amebas patógenas y otros a las no patógenas, pero debido a lo dispendioso de la técnica no se utiliza para fines diagnósticos [27, 28]; otros son inmuno ensayos basados en la presencia de anticuerpos monoclonales y de antígenos de superficie distintos en la especie patógena y no patógena [29], por otra parte es a implementado la determinación de una lectina de adherencia (galactosa y N-acetil galactosamina Gal/GalNac) por PCR para la identificación de las especies [8, 30], por último la amplificación por PCR de fragmentos específicos (RFLP) de ADN genómico permite de igual manera realizar el diagnóstico diferencial de las especies [30-32]. En

estudios puntuales se han empleado marcadores moleculares tales como Adhesina, Gal/GalNAc-lectina y la sub unidad pequeña rRNA los cuales han permitido la diferenciación de las especies del *complejo E. histolytica/ E. dispar* y ahora la presencia de *E. moshkovskii* [33]

1.1.2 *Giardia duodenalis*

La giardiasis presenta una prevalencia elevada en países en desarrollo, se estima que 200 millones de personas presentan síntomas y se reportan 500.000 nuevos casos por año. La enfermedad es ocasionada por *G.duodenalis*, patógeno entérico en humanos, animales domésticos y de vida silvestre [34]. Su distribución geográfica es cosmopolita; en Colombia la prevalencia es del 13.5% en población general y en niños de uno a cuatro años es del 28% [8]. En un estudio retrospectivo se describe la incidencia de giardiasis en Colombia, para los años 2009-2013 mostrando que, de 15.851 casos, el 50,3% eran mujeres; 58.4% tenían menos de 10 años y 14.8% tenían entre 10-19 años. Otros datos indican que en los países industrializados la prevalencia oscila entre el 2% y el 5% y la tasa para los países en desarrollo oscila entre el 20% y el 30% [35].

La transmisión se hace de persona a persona o de animales reservorios como perros, gatos, castores y rumiantes a personas, en cuyo caso esta parasitosis se puede considerar como una zoonosis [36, 37].

En cuanto al diagnóstico, es basado en la visualización de quistes o trofozoítos en materia fecal a partir de técnicas basadas en microscopía como coloraciones con hematoxilina eosina o métodos de concentración como formol-éter. Debido a que hay excreción intermitente de quistes, se recomienda hacer varios exámenes coprológicos en días diferentes.

Estudios realizados a partir de aislamientos de *G. duodenalis*, han permitido mediante el análisis de ADN caracterizar la diversidad genética del parasito, en base a marcadores moleculares, tales como la subunidad pequeña rRNA, glutamato deshidrogenasa (*gdh*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*) y β-Giardin [38], permitiendo identificar ocho ensamblajes, donde el ensamblaje A y B están relacionados con infecciones en humanos y animales, estos subdivididos a su vez en suben ensamblajes: AI, AII, BIII y BIV sin asociaciones

estrictas basadas en la presentación clínica [39, 40]. Los ensamblajes C y D infectan perros, ensamblaje E que infecta rumiantes y cerdos; ensamblaje F a gatos; G que infecta a roedores y al ensamblaje H que se encuentra frecuentemente infectando focas y gaviotas [41].

Estas subpoblaciones parásitas son de importancia epidemiológica por considerarse como una posible zoonosis y una amplia distribución en animales domésticos que generan diferentes rutas de transmisión [42]. Este parásito re-emergente es un protozoario que produce condiciones sintomáticas tales como diarrea, dolor abdominal y síndrome de malabsorción [43, 44], ya que comparten características morfológicas similares, razón por la cual su identificación con técnicas convencionales no es posible, deja ver la importancia de la aplicación de técnicas moleculares que permitan identificarlas ya que son de importancia epidemiológica por su potencial zoonótico y amplia distribución en animales domésticos.

1.1.3 *Cryptosporidium* spp

La cryptosporidiosis es una enfermedad usualmente presente en síndromes gastro entéricos; generado por protozoarios de la subclase Coccidia del genero *Cryptosporidium*, es causa de enfermedad diarreica, especialmente en niños menores de 5 años y pacientes con deficiencias inmunológicas [45]. Diferentes reportes indican que la criptosporidiosis ocasiona más de 99.000 muertes y 8.3 millones de discapacidades (ajustadas por año de vida), la mayoría de estas muertes e incapacidades son frecuentes en países en desarrollo [4].

La infección puede presentarse de forma sintomática o asintomática ocasionando en algunos individuos diarrea secretoria y síndrome de malabsorción [46]. Debido a la capacidad de *Cryptosporidium* para infectar varios animales y la presencia de los ooquistes en el medio ambiente, los seres humanos pueden contraer la infección a través de diferentes vías de transmisión, como el contacto directo, con animales (zoonótico), a ingestión de alimentos contaminados y el consumo de agua. La importancia de estas vías de transmisión en la epidemiología de la criptosporidiosis no está del todo claro, debido a que los diagnósticos tradicionales no tienen la capacidad de diferenciar las especies del parásito y su sensibilidad es variable [47].

El método de identificación rutinario, se basa en la coloración por el método de Ziehl-Neelsen modificado (Z-N) a partir de examen directo; en el cual permite observar el ooquiste esporulado de *Cryptosporidium* spp [48, 49], de tal manera que se observan de color rojo brillante sobre un fondo azul [50, 51]. Debido a la descripción de un bajo número de ooquistes en muestras, son necesarios métodos que brinden mayor sensibilidad para detectar ooquistes en muestras [52]. Las herramientas moleculares se han utilizado para discriminar especies de *Cryptosporidium* spp, hasta el momento se han descrito más de veinte especies, y se han reportado en los seres humanos, incluyendo *C. hominis, C. parvum, C. meleagridis, C. felis, C. canis, C. cuniculus, C. ubiquitum, C. viatorum, C. muris , C. suis, C. fayeri, C. andersoni, C. bovis, C. scrofarum, C. tyzzeri, C. erinacei,* los genotipos con base en los marcadores moleculares como la subunidad pequeña rRNA, Hsp 70 y la proteína de pared de ooquiste (COWP) [53], otra de las herramientas de subtipificación más usada es el análisis de la secuencia de ADN de la glicoproteína de 60 kDa (gp60, también denominada gp40 / 15); Gp60 se encuentra en la superficie de la región apical de las fases invasoras del parásito, y una de las dianas dominantes para neutralizar la respuesta de anticuerpos en los seres humanos [47]. Por lo tanto, es posible vincular las características biológicas de los parásitos y presentaciones clínicas con la identidad de la familia del subtipo.

Útil para la diferenciación de especies y subfamilias; el gen es similar a una secuencia de microsatélites al tener repeticiones en tándem de trinucleótidos codificante de serina TCA, TCG o TCT en el extremo 5´del gen; además de las variaciones en el número de repeticiones de trinucleótidos, existen secuencias con diferencias en las regiones no repetidas, lo cual permite clasificar a *C. parvum y C. hominis* en varias familias de subtipos [47]. Dentro de cada subtipo de familia, los subtipos también difieren entre sí principalmente en el número de repeticiones de trinucleótidos, el nombre de los subtipos comienza con el subtipo de la familia, para *C. hominis* se denominan (Ia, Ib, Id, Ie, If, etc) y para *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, etc), seguido por el número de repeticiones de los microsatelites representado por la letra A, G y T) [54]. Así, el nombre IbA10G2 indica que el parásito pertenece a la familia de *Cryptosporidium* subtipo *hominis* y tiene 10 copias de la repetición TCA y dos copias de TCG en la región de repetición de trinucleótidos del gen gp60. Algunos subtipos también tienen dos copias de la secuencia de ACATCA inmediatamente después de la repetición trinucleótido, representados por la letra“R”. Por

lo tanto, el nombre IaA28R4 indica que el parásito pertenece al subtipo *C. hominis* familia Ia, y cuenta con 28 copias de la repetición de TCA en la región trinucleotídica y cuatro copias de repeticiones con 13-15 pb. En el caso de *C. parvum* familia del subtipo IIc, tienen cinco copias de TCA y tres copias de TCG así IIcA5G3 se diferenciaban entre sí en la secuencia de nucleótidos de la región 3´del gen, siendo asignado como IIcA5G3a. y los subtipos que divergieron de esta secuencia Se les asignaron subsiguientes extensiones alfabéticas [47]. Estas herramientas son ahora cada vez más utilizadas en los estudios epidemiológicos de la criptosporidiosis en las zonas endémicas, que ha mejorado significativamente la comprensión de la transmisión de la criptosporidiosis en humanos y animales [47].

1.1.4 *Blastocystis* sp

La Blastocistosis, es una infección intestinal ocasionada por un protozoo entérico, que afecta la fisiología y la respuesta inmune en el hospedero generando diferentes cuadros sintomáticos y asintomáticos [55]. Éste parásito es de distribución cosmopolita; *Blastocystis* spp se estima que este microorganismo infecta entre uno y dos millones de personas en el mundo y su frecuencia es mayor en países en vía de desarrollo [56]. Del mismo modo, la colonización intestinal causada por *Blastocystis* sp que se observa a menudo en muestras de heces de seres humanos y animales; con una frecuencia de distribución mundial que alcanza el 100% en los países en desarrollo y supera el 56% en los países desarrollados [57].

La patogenicidad de éste protozoario sigue siendo controvertido, algunos autores sugieren que la presencia de infección puede causar diarrea, flatulencia, inflamación, urticaria y síndrome del intestino irritable (SII) [58]. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la colonización por *Blastocystis* sp se asocia generalmente con una flora intestinal sana y se encuentra en el microbioma, cuando hay una disbiosis intestinal generalmente se encuentra en enfermedades inflamatorias metabólicos o infecciosos del tracto gastrointestinal inferior [59]. Además, un enfoque en metagenómica mostró que los individuos con microbiota intestinal con presencia *Blastocystis* sp en materia fecal, fueron mucho menos propensos a tener Bacteriodes infecciones con Ruminococcus y Prevotella, esto muestran que la presencia de *Blastocystis* sp podría ser beneficiosa para la salud

humana [60]. Es entonces, que el enfoque en *Blastocystis* sp puede estar pasando a una perspectiva de Salud Pública [61], importante para el control y vigilancia, la presencia de este parásito y su potencial patogénico es hasta el momento controvertido puesto que se ha encontrado tanto en pacientes asintomáticos, como en otros que presentan síntomas leves de incomodidad intestinal hasta la presentación de manifestaciones clínicas [62].

El diagnóstico convencional se lleva a cabo mediante montaje directo o el uso de coloraciones como la tricrómica [29]. De forma paralela, se han desarrollado técnicas moleculares, empleando el marcador molecular la sub unidad pequeña rRNA, se ha observado la sub división del género *Blastocystis* en subtipos (STS) y hasta el momento, se han identificado 17 STs. Los ST relacionados con infecciones en humanos y animales son 1-9 y 12, y los ST 10, 11, 13-17 solo han sido detectados en animales [57]. Sin embargo, la patogenicidad de este organismo está fuertemente debatida, debido principalmente a una alta tasa de portadores asintomáticos, a las diferencias en la susceptibilidad del huésped, a la microbiota intestinal y / oa diferentes potencialidades patogénicas de diferentes ST genéticos [63, 64]. En el caso de Colombia, los estudios reportados sugieren la existencia de las ST 1, 2, 3, 4, 6 y 7 [65].

Algunos autores sugieren que la patogénesis de *Blastocystis* puede depender del ST pero aún los datos epidemiológicos con los que se cuenta son escasos y contradictorios; hasta el momento ha comenzado a emerger en diferentes puntos geográficos información sobre la frecuencia y los STs en diferentes microorganismos, pero al relación de estos con los pacientes asintomáticos es escasa, he aquí que el conocimiento respecto a la naturaleza patogénica de *Blastocystis* sp es poca para llegar a comprender la vinculación directa ente los ST y los síntomas en infecciones intestinales [66] ya que presenta una distribución cosmopolita, no es posible distinguir entre la colonización y la infección presente en un individuo [67].

1.2 Geohelmintos

Dentro de las helmintiasis, existe un grupo de parasitosis intestinales transmitidas por el contacto con suelo contaminado, llamadas geohelmintiasis, que corresponden a infecciones transmitidas por los huevos larvados o las larvas de los helmintos que se encuentran en el suelo o la tierra contaminando las aguas o alimentos como frutas y

verduras que son consumidas de forma cruda. Las especies de helmintos transmitidos por el suelo que infectan al hombre, de interés en salud pública son *Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura* y las uncinarias (*Necator americanus y Ancylostoma duodenale*) [68], de igual manera son los más comunes y persistentes en el mundo, las infecciones son dadas por la ingestión de huevos o la penetración de las larvas a través de la piel [68]. Según las últimas estimaciones, 800 millones de personas están infectadas con *Ascaris lumbricoides*, 600 millones con *Trichuris trichiura* y 600 millones con *Necator americanus y Ancylostoma duodenale* [11].

En Colombia, según la última encuesta Nacional de Parasitismo intestinal en población escolar 2012-2014, la frecuencia a nivel nacional de geohelmintos fue en primer lugar *Trichuris trichura* 18,4% siendo más frecuente en Santa Marta 61%, en segundo lugar, *Ascaris lumbricoides* 11,3% más frecuente en Amazonía con un 58% y en tercer lugar las Uncinarias 6,4% también más frecuente en la Amazonia colombiana con 35,7% [6].

En cuanto el diagnóstico, se puede realizar coprológico directo, en el cual se realiza la búsqueda de huevos, acompañado de una técnica de concentración. Aunque la técnica de elección es el Kato-katz, empleada para determinar la intensidad de la infección por geohelmintos [69], esto de acuerdo al número de huevos por gramo de materia fecal (h.p.g.) presentes en una muestra, es el método recomendado por la OMS, tanto a nivel individual como para estudios epidemiológicos. Con los métodos de concentración se pueden clasificar las intensidades parasitarias en una población, siguiendo con los parámetros establecidos por la OPS [69] se ilustra la clasificación en la siguiente tabla

Tabla 1 Clasificación de la intensidad de infección por helmintos (huevos de helmintos)

Parásito	Leve hpg*	Moderada hpg*	Severa hpg*
A. lumbricoides	1 - 4.999	5.000 – 49.999	> 50.000
T. trichiura	1 - 999	1.000 – 9.999	≥ 10.000
***Uncinarias* sp**	1 – 1.999	2.000 – 3.999	≥ 4.000

* Huevos por gramo de materia fecal

1.2.1 *Ascaris lumbricoides*

La Ascariasis es la parasitosis más frecuente y cosmopolita de las helmintiasis humanas, en Colombia la prevalencia es de 33.6% y contribuye a la desnutrición en niños, complicaciones intestinales y extraintestinales [8]. Ocasionado por el nemátodo *A. lumbricoides* con distribución en las zonas tropicales y templadas del mundo.

La patogénesis producida por *A. lumbricoides* depende de la localización del parásito y del grado de infección que se presente. Entre la patología inducida por las formas adultas se destacan manifestaciones de malabsorción, obstrucción intestinal e invasión del conducto biliar o del apéndice, dando lugar a pancreatitis aguda y/o apendicitis [70].

Debido a que morfológicamente, las características que comparten entre sí las diferentes especies de *Ascaris* su diferenciación e identificación se basa en su caracterización genética, esto para el mundo es importante y se traduce en la explicación de la epidemiología, del conocimiento de las cepas infectantes entre las diferentes especies, y también en poder conocer el estado taxonómico de las especies de *Ascaris*. algunos estudios basados en la epidemiologia molecular con el uso de marcadores polimórficos como el espaciador interno (ITS1), mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (cox1), NADH deshidrogenasa subunidad 1 (nad1) y los marcadores de microsatélites, se proponen para explicar el origen de los taxones de *Ascaris* en sus respectivos hospederos. [71, 72].

El desarrollo de técnicas moleculares, ha permitido aplicar marcadores como el ITS 1 y el uso de microsatélites [73] para la identificación de especies de *Ascaris*, de igual manera el uso de ITS 1 para una PCR multiplex ha demostrado la capacidad de identificar las especies de *Ascaris* [74].

1.2.2 *Trichiuris trichiura*

La tricocefalosis es otra helmintiasis que afecta al hombre, con una amplia distribución geográfica, aunque predomina en zonas cálidas y húmedas de países tropicales, de distribución cosmopolita; su frecuencia es alta en regiones tropicales, principalmente en zonas húmedas y cálidas. Infecta aproximadamente, 600 millones de personas en todo el

mundo, de igual manera infecta a otros huéspedes animales, incluyendo cerdos (*T.suis*), perros (*T. vulpis*) y primates no humanos, y causan enfermedad en estos hospederos, y su cuadro clínico o desarrollo de síntomas es similar a la tricuriasis de los seres humanos [75]. En Colombia la prevalencia de tricocefalosis es de 37.5%. [8]

Aunque las especies de *Trichuris* se consideran hospedero específico, ha habido considerable controversia, en cuanto a si *T. trichiura y T. suis* son iguales o especies diferentes y si los seres humanos pueden infectarse con *T. suis*, en países endémicos en los que ambas especies viven en estrecha asociación con el hombre [75]. Se ha caracterizado la totalidad de los genomas mitocondriales de *Trichuris* derivado de muestras humanas y derivado de cerdos, comprobándose la hipótesis de que los parásitos de estas dos especies hospedantes son genéticamente diferentes. Tomados en conjunto, los hallazgos apoyan la propuesta de que *T. trichiura Y T. suis* son especies separadas, congruentes con datos previos para el ADN ribosómico. Utilizando herramientas analíticas moleculares, se aplica el uso de los marcadores moleculares espaciadores transcritos internos, ITS-1 e ITS-2, de ADN ribosómico nuclear [76]. Todos los genes codificantes se utilizan como marcadores en estudios comparativos de análisis filogenético [75, 77].

1.2.3 Uncinarias: *Ancylostoma duodenale y Necator americanus*

Las uncinariasis también llamadas anquilostomiasis o anemia tropical, es una parasitosis intestinal que genera una anemia severa en las personas infectadas, os anquilostomas son algunos de los nematodos parásitos intestinales más comunes, infectando a un estimado de 1.3 millones de personas en todo el mundo [78]. En Colombia la uncinariasis presenta una prevalencia de 21.1% [8].

Los pacientes con uncinariasis suelen ser asintomáticos; sin embargo, la infección crónica es una causa frecuente de anemia hipocrómica microcítica, llevando incluso a retraso del crecimiento y generando deficiencias cognitivas en niños [79][80].

En el momento de realizar el diagnóstico, si la muestra se almacena a temperatura ambiente por más de 24 horas, el embrión continúa su desarrollo y puede emerger la larva

rhabditiforme o visualizarse en materia fecal; en este caso debe diferenciarse de *Strongyloides stercoralis* [8].

Existen métodos basados en PCR para la detección específica de los nematodos, se han utilizado con éxito, en la PCR en tiempo real usando detección fluorescente y la secuencia de Espaciador Interno Transcrito 2 (ITS2) [78]. Son los marcadores de elección para la diferenciación de especies de uncinarias N. americanus y A. duodenale [81].

2. Capítulo 2 Herramientas moleculares empleadas para la identificación de parásitos intestinales

Se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basadas en la identificación del ADN parasitario, con el fin de garantizar la presencia del mismo en infecciones leves y a su vez poder llegar a diferenciar especies de parásitos presentes en una muestra de materia fecal.

La detección de este ADN a partir de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es útil para identificar una variedad de enteropatógenos entre los cuáles se encuentran bacterias, virus y parasitarios a partir de una única muestra. Estos métodos son más rápidos y con mejor sensibilidad y tienen la capacidad de detectar una amplia gama de patógenos, representando una mejora significativa en los enfoques diagnósticos, ya que todas las pruebas diagnósticas tienen por objeto en definitiva brindar plataformas de diagnóstico más precisas y obtener resultados oportunos [20].

Con el uso rutinario de diagnóstico como microscopía para la identificación de formas parasitarias en muestras de materia fecal, estos parásitos son notoriamente difíciles de detectar, es así que el uso de herramientas basadas en la identificación de ácidos nucleicos de los parásitos ha facilitado tanto la detección y la diferenciación de las especies implicadas en las infecciones intestinales.

En la siguiente tabla, se ilustran algunos de los marcadores moleculares empleados para la identificación de diferentes parásitos intestinales.

Tabla 2 Pruebas moleculares empeladas para la identificación de Parásitos Intestinales

Técnica	Parásitos donde se ha aplicado	MARCADOR	REFERENCIA
PCR	*E.histolytica/E.dispar*	SSUrRNA	[8]
	Giardia (SSU-rDNA)	SSUrDNA β-giardin TPI, GDH	[36]
	Cryptosporidium spp.	SSUrDNA Hsp 70	[52]
	Blastocystis sp.	18s rRNA	[57]
RFLP	*Giardia duodenalis*	β-giardin	[4]
	Cryptosporidium spp.	SSU rRNA, GP60, Hsp70, Proteína COWP	[4]
	Blastocystis sp.	18 s	[56]
LAMP	*E.histolytica*	SSUrRNA	[4]
qPCR	*E.histolytica*	(SSU rRNA)	[4,26,28,30]
	Giardia. (GDH)	β-giardin GDH	[32,34,35,37]
	Cryptosporidium	Proteina COWP	[48,50,52]
	Blastocystis	18s rRNA	[109,114]
	N. americanus, A. duodenale	ITS2	[78,81]
	Ascaris lumbricoides	ITS1 Cytb	[71,72]
	Trichuris trichiura	SSUrRNA ITS 1y 2	[75,76]

En la tabla 2, se encuentran algunos blancos moleculares empleados en las diferentes técnicas desarrolladas para la identificación de parásitos intestinales

2.1 Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)

Técnica en la cual, los productos de PCR se digieren con enzimas de restricción para producir diferentes números y tamaños de fragmentos, esto dependiendo de las diferencias en el número y ubicación de los sitios de restricción en el amplicón. Los genes diana y enzimas de restricción se eligen de manera que, por ejemplo, diferentes especies dentro de un género producen la amplificación del mismo tamaño, pero revelan diferentes patrones de bandas en gel electroforesis después de la digestión [24], permitiendo así diferenciarlos de acuerdo a este patrón.

2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional

La PCR permite la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico en un proceso cíclico de desnaturalización, hibridación de cebadores, y el alargamiento de la cadena de ADN utilizando enzima, (polimerasa termoestable), los productos de amplificación en una PCR convencional son visualizados posteriormente con electroforesis en gel de agarosa. Su especificidad se basa en el tamaño esperado del producto de PCR [24].

La PCR Multiplex, para diferentes dianas de ADN, se puede lograr eligiendo cebadores para cada objetivo, de tal manera que se obtengan los amplicones de diferentes tamaños para cada objetivo [24, 82].

2.3 Amplificación isotérmica mediada por Loop (LAMP)

La amplificación isotérmica mediada por Loop (LAMP) típicamente utiliza cuatro oligonucleótidos específicos de la diana para amplificar ADN bajo condiciones isotérmicas. El producto amplificado puede ser detectado a simple vista como un precipitado blanco en el tubo de reacción o bajo luz UV después de la adición de un colorante [83].

Éste ensayo fue aplicado por Mori y colaboradores en 2001, utilizando un conjunto de dos cebadores internos diseñados específicamente y dos cebadores externos que reconocen seis regiones distintas del ADN blanco, además de las altas concentraciones de pirofosfato de magnesio que se precipitan a partir de la amplificación del ADN generan la turbidez siendo proporcional a la cantidad de ADN sintetizado en la reacción [84].

2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) abrió nuevas perspectivas basadas en la posibilidad de generar resultados cuantitativos e identificar la cantidad de organismos patógenos en muestras clínicas [85, 86]. La concentración de la secuencia blanco se determina por la acumulación de fluorescencia a medida que ocurre la amplificación. El ciclo de amplificación en el que la cantidad de fluorescencia acumulada supera el umbral establecido se conoce como ciclo umbral (Ct, del inglés threshold cycle) [87]

Con ésta PCR la producción de amplicones se mide en "Tiempo real" durante el proceso de amplificación. Existen varios métodos para su desarrollo, que van desde el uso de colorantes intercalantes hasta sondas de ADN marcadas con fluorescencia. Uno de los más utilizados son los basados en sondas TaqMan, en la que se emplean exonucleasas, que con la actividad de la Taq polimerasa escinde la sonda hibridada durante la fase de elongación de la reacción de amplificación y permite la emisión de fluorescencia [88, 89], resultando en una señal fluorescente que puede ser medida después de cada amplificación en cada ciclo. La amplificación también se puede detectar mediante el uso de fluorescencia con transferencia de energía de resonancia, con ésta se emplean sondas de hibridación adyacentes con una molécula donante y un aceptor fluorescente [24]

En cuanto a la cuantificación absoluta, se requiere de una curva estándar que relacione el logaritmo de la concentración de ADN de un patrón conocido y sus diluciones con los Ct resultantes de la qPCR de las muestras a evaluar [90].

Debido a su sensibilidad y especificidad, se han diseñado estrategias que permiten evaluar la eficiencia de esta estrategia molecular, esta eficiencia relaciona diferentes aspectos que pueden intervenir con el buen funcionamiento de la técnica, los cuales se mencionan a continuación.

3. Capítulo 3: Comunidades Indígenas. Amazonas-Colombia

La cuenca del Amazonas, comprende un área de siete millones de km.², representa una importancia ambiental irreemplazable, cumple funciones reguladoras del clima de casi toda América del Sur y sus ecosistemas de selva son grandes procesadores de dióxido de carbono y suministradores de oxígeno. Esta región, ocupa el 42% del territorio colombiano (483.119 km.²) debido a su territorio mayoritariamente selvático, juega un papel importante para el desarrollo de las políticas ambientales a nivel nacional y continental, aunque contradictorio a esto, existen la oposición entre la preservación de su patrimonio natural y las posibilidades de desarrollo de su población, aunque el 81% (390.304 km.²) de esta zona se encuentra protegida por 186 resguardos indígenas, 14 áreas protegidas y la Reserva Forestal de la Amazonia, se encuentra en riesgo debido a los conflictos que la aquejan, tales como la política de inversión en explotaciones económicas como la mineria [91].

Amazonas es el departamento que alberga la mayor diversidad de pueblos indígenas después del Vaupés; de 611 pueblos indígenas existentes en la región amazónica, 22 se encuentran en el departamento de Amazonas mostrando gran diversidad lingüística y cultural [91]. El Amazonas es uno de los 32 departamentos de Colombia, ubicado en la parte meridional del país, al sur de la línea ecuatorial, limitada con los departamentos de Caquetá y Vaupés y al noroeste con el departamento del Putumayo, y el resto de su territorio es de frontera internacional con Brasil y Perú; al sur del río Putumayo, se denomina "Trapecio Amazónico", el cual incluye la triple frontera de Colombia, Perú y Brasil. Cuenta con una inmensa extensión de selva, conformado por dos municipios: Leticia y Puerto Nariño y nueve corregimientos departamentales: El Encanto, La Chorrera,

La Pedrera, La Victoria, Mirití-Paraná, Puerto Alegría, Puerto Arica, Puerto Santander y Tarapacá.

3.1 Características biogeográficas

El Departamento de Amazonas se encuentra localizado en el extremo sur del territorio continental colombiano, entre las coordenadas geográficas está situado a 00° 07' 08" de latitud norte y a 04° 13' 19" latitud sur, y a 69° 39' 41" y a 74° 23' 21" de longitud oeste. Según el censo 2005 realizado por el DANE, habitan 67.726 personas, 37,8% de ellas en el área rural y 62,2% en el área urbana.

Cuenta con una superficie territorial de 483.037 km2, 42% del área continental nacional y 6,5% de la Amazonia total. Su territorio presenta numerosas lagunas y zonas pantanosas, conformado por dos partes: el Trapecio Amazónico limitada al sur por el río Amazonas; junto con los departamentos de Vaupés, Guainía, Guaviare, Caquetá y Putumayo, conforma la región amazónica colombiana, el 36% del territorio nacional que alberga el 10% de la biodiversidad a nivel mundial.

3.1.1 Demografía

Demográficamente y de acuerdo a los registros del Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas DANE, se ha reportado una población total para el departamento de Amazonas de 46.950, de los cuales 32.450 de los habitantes se encuentran concentrados en Leticia, 6.816 en Puerto Nariño y el resto en los corregimientos departamentales. En cuanto a la población infantil, los menores de 5 años representan el 16,6% (12.221) del total de la población del departamento, los niños y niñas entre 6 y 11 años el 15,3% (11.250) y el 14,5% (10.703) lo ocupan los adolescentes entre 12 y 17 años [92].

3.2 Características socio-económicas

Según el Índice de Necesidades básicas insatisfechas (NBI) para el departamento según fuente DANE es de 44.41% siendo mayor en el área rural con un 59,38%. En corregimientos departamentales es del 100% por no contar con información suficiente para su estimación, el municipio de Leticia presenta un NBI de 37,65% siendo mayor en el área

rural. Para el municipio de Puerto Nariño las cifras son mayores, encontrándose un 58,35% de personas con necesidades básicas insatisfechas siendo mayor el valor en el área rural [92].

Las condiciones de vida de los pueblos indígenas se organizan de acuerdo a diferentes grados de vinculación al mercado. Los pueblos indígenas próximos a los cascos urbanos y los centros corregimentales del departamento del Amazonas, aun cuando disponen de tierra cultivable para el sustento autónomo, dependen de trabajos asalariados para obtener mercancías que se han vuelto indispensables [91].

Esta desigual vinculación y acceso a las necesidades básicas y al mercado asequible a su población, pone al descubierto una serie de clasificaciones culturales jerarquizadas en las que los indígenas aparecen en el lugar más bajo e inequitativo de la relación con el mercado. Esto es especialmente notorio en la ciudad de Leticia como centro capital departamental y fronterizo. Gradualmente Leticia se ha constituido en un centro dinamizador del poblamiento, reúne indígenas de diversos orígenes étnicos, principalmente tikunas, uitotos, boras, mirañas, andokes, yucunas, macunas, muinanes, cocamas, además de colombianos, peruanos y brasileros [93], conforman un complejo conjunto de relaciones sociales que se encuentran jerarquizadas bajo principios raciales y económicos [91].

3.3 Composición étnica

El 43,4% de la población es indígena y más del 80% del territorio del departamento es considerado resguardo indígena. El Censo General 2005 reporta que el 40,47% está integrada por indígenas pertenecientes a los pueblos Ticuna, Huitoto, Cocama; Kamejeya, Jurumi, Jeruriwa, Imike, Piyoti (denominados como Yukuna); Idemasâ, Jeañârâ, Majiña (conocidos como Macuna), Bora; Yuiweje maja o Jobokarâ (llamados genéricamente Tanimuka), Miraña, Inga, Yagua, Upichia (Matapi), Muiname, Andoque, Wejeñememajâ (Letuama), Ocaina, Carijona; Yujup (Makú), Nonuya, Siona, Tucano, Tariano, Cavillary (Kawiyari), Barasano, Cubeo, Yaurâ (Yauna), Yuri (Carabayo) y Yanacona. El 50,85% son no indígenas que proceden o son descendientes de población llegada de la costa atlántica, de Antioquia, del eje cafetero, del Tolima, del Huila y de Bogotá, y el 1,84% está

representado por afro descendientes [92]. En cuanto al lenguaje, habitan 22 pueblos indígenas pertenecientes a por lo menos 13 familias lingüísticas: tukano oriental y occidental, bora, uitoto, arawak, yagua, ticuna, tupi guarani, caribe, andoque, quechua, yurí; los 22 pueblos indígenas del Amazonas, cuya población asciende a 20.922 personas, corresponden al 29,68% de la población total del departamento [91].

3.4 Condiciones de vida

El modo de vivienda y servicios públicos en los grupos domésticos indígenas, en su mayoría ocupan las áreas rurales, predominan las familias extensas, del total reportado, 9.067 viviendas son habitadas por 1 familia; en 206 viviendas viven 2 familias; en 79 viviendas viven 3 familias; y en 40 viviendas, habitan más de 4 familias es así; que tiene una deficiencia de 10.000 mil viviendas, un déficit habitacional que muestra el gradual crecimiento de las pobladoras en los cascos urbanos. Respecto a los servicios públicos, algunas viviendas en el departamento tienen acceso al agua, energía eléctrica, alcantarillado y manejo de residuos sólidos; pero aproximadamente, 2.348 viviendas no gozan de estos servicios, siendo mayormente afectada el área rural. La construcción de sistemas de alcantarillado en las comunidades se requiere de manera urgente, teniendo en cuenta que 3.860 viviendas rurales no gozan de este servicio y viven en puntos importantes de agua (Lagos de Yahuarcaca, río Loretoyacu, Cará-Paraná, Igará-Paraná, La Tonina, Miritíi-Paraná, Putumayo, Quebrada la Maloca, Cotuhé), lugares en los que el agua para el consumo se obtiene a partir de fuentes naturales que están siendo contaminadas por la deposición de aguas residuales y aguas negras [91].

El agua de consumo, se obtiene también por aguas lluvias recogidas, que tomando en cuenta el régimen estacional de lluvias, no son siempre una garantía de acceso al agua potable. Igual situación presenta los cuerpos de agua de los que se surte el servicio para los acueductos de Leticia, Tarapacá, Pedrera y Puerto Nariño. En cuanto al factor ambiental, en el departamento de Amazonas respecto a la producción de residuos sólidos la situación es preocupante, en el 2010 se alcanzó la elevada producción de 31.004 kilos diarios de basuras, en las que el 60.6% es de origen residencial, el 27,27% de origen comercial, un 9,09% de origen industrial y un 3,03% de origen hospitalario. La disposición final de estos residuos se hace a campo abierto y próxima a cuerpos de agua, lo que

además de producir contaminación química y bacteriológica genera impactos ambientales irreversibles [94].

La prestación del servicio educativo en el departamento, se brinda en instituciones educativas de carácter oficial y privado y en escuelas comunitarias. El sector de mayor cobertura es el oficial en los niveles de educación preescolar 57,9%, básica primaria 40,1%, secundaria 24,9% y media 26,1% en ultima se encuentra jardín y pre-jardín con 26,1% de cobertura; la educación superior en el departamento de Amazonas en los últimos siete años registra un incremento de 5,95% anual; de 95 estudiantes inscritos en 2002, se ascendió a 361 en 2003 y 1.000 estudiantes en 2009 [91].

En el sector salud, las condiciones de salud en el departamento del Amazonas son precarias, desde el punto de vista epidemiológico, el departamento presenta una alta incidencia de enfermedades con una elevada concurrencia y prevalencia de afecciones asociadas a condiciones de pobreza y ausencia de programas en salud preventiva, como el poliparasitismo intestinal, enfermedad diarreica aguda (13,6%), infección respiratoria aguda (15,83%) y la tuberculosis (8,64%); las cuales afectan gravemente a la población en el departamento, con especial recurrencia en la población infantil [91], adicionalmente el 12,96% de la población infantil sufre desnutrición (anemias y deficiencias nutricionales).

3.5 Legislación

La Constitución Política de 1991 (artículo 246 y 330), la legislación nacional (Ley 89 de 1890) y la jurisprudencia constitucional (S.C. 088, de 2001), reconocen a las autoridades indígenas como autoridades públicas y administrativas; esto ocasiona que presenten un limbo jurídico en cuanto a su administración y gobierno, entendiendo que el 93% de su territorio no cuenta con entidades territoriales de nivel local, situación que afecta directamente la gobernabilidad de los pueblos indígenas.

La figura constitucional de Entidad Territorial Indígena (ETI) aún no ha sido reglamentada, incorporando así la figura transitoria de Asociaciones de Autoridades Tradicionales Indígenas (AATI´s) (Decreto 1088 de 1993), con el fin de mantener una interlocución político administrativa con el Estado y otros actores económicos, políticos o ambientales.

Esta inseguridad jurídica propicia una superposición de autoridades a nivel administrativo, ambiental y político en los niveles local y nacional, las cuales trabajan de manera desarticulada y sin una definición respecto a sus funciones y competencias, dejando a las autoridades indígenas y a sus representantes atrapados en las estructuras del Estado y con poco margen de maniobra sobre sus territorios y comunidades.

4. Capítulo 4: Antecedentes

Generalmente la incidencia y prevalencia de parásitos intestinales es mayor en los niños que en los adultos, debido posiblemente a la falta de resistencia natural o adquirida y a las diferencias de comportamiento y hábitos. Las infecciones parasitarias están estrechamente relacionadas con determinantes ambientales y socio-económicas, generando un mayor riesgo como: mala alimentación, condiciones de vivienda precarias, saneamiento inadecuado, carencia de agua potable y falta de higiene en la preparación y almacenamiento de los alimentos [95]. Una frecuencia desproporcionada de las parasitosis como por ejemplo las geohelmintiasis, en poblaciones humanas se produce con mayor frecuencia en los sectores marginados, de bajos ingresos, y las regiones con limitados recursos, éste fenómeno es persistente a nivel mundial; con frecuencia de más de mil millones de personas con infecciones parasitarias, en zonas como África subsahariana y América, la morbilidad causada por infecciones tales impone una carga sustancial de la enfermedad, lo que contribuye a un círculo vicioso de infección, favorecido por la pobreza, la disminución de la productividad y el desarrollo socioeconómico insuficiente [1]

Se han hecho varios esfuerzos para el mejoramiento del diagnóstico de las infecciones parasitarias, uno es la implementación de pruebas moleculares basadas en la identificación de ADN parasitario, que permite hacer una identificación específica de los diferentes agentes patógenos y por ende un diagnóstico diferencial en caso de presentarse patologías asociadas a la presencia de los mismos; a nivel del individuo esto se traduce en un tratamiento específico y oportuno contra el microorganismo causante de su patología [11]. En cuanto a los estudios realizados empleando técnicas moleculares para la identificación de parásitos intestinales, encontramos algunos estudios que se basan en

realizar la comparación de los resultados obtenidos junto con los reportados con técnicas convencionales con el fin de evidenciar diferencias en los diagnósticos.

Los parásitos son los agentes infecciosos más comunes causando diarrea persistente, de los cuales los protozoarios más importantes son: *G. duodenalis, Cryptosporidium* spp*, E. histolytica, Cyclospora, Cystoisospora belli, Dientamoeba fragilis*. Una causa parasitaria menos común de la diarrea persistente es el *Blastocystis* sp, su papel como patógeno no está claro, ya que muchas personas con infección con este microorganismo, no presentan manifestaciones clínicas aparentes [20]. Por otra parte, la diarrea persistente en lactantes y niños pequeños se asocia con una elevada mortalidad, atribuible a enfermedades como la desnutrición. En algunos estudios se asoció positivamente la presencia de *G. duodenalis* con la diarrea en un metanálisis de 5 estudios que incluyeron niños y adultos en países en desarrollo. Los estudios en los países en desarrollo que incluyen en ese trabajo, muestran la importancia de protozoarios, bacterianos, e infecciones virales en diarrea persistente. De igual manera la coinfección con más de 1 patógeno se evidencia en gran número de pacientes con diarrea persistente (14% a 54% de los pacientes estudiados) [20].

Para algunos protozoos de importancia clínica, como lo es el Complejo *E.histolytica,/E.dispar/E.moshkovskii*, un estudio realizado en julio del 2007 abril 2008 para la diferenciación del complejo, solamente de 100 muestras reportadas anteriormente como positivas, se encontraron en el laboratorio de parasitología determinando el gen Gal/GalNAc-lectina mediante ELISA y la amplificación del ADN genómico por PCR, se encontró una sola muestra positiva para *E. histolytica* y 5 muestras positivas para *E. dispar* a diferencia de lo reportado como complejo inicialmente [96].

Otro estudio similar al anterior fue realizado para la diferenciación de *E. histolytica y E. dispar* en muestras de materia fecal por detección de la adhesina de *E. histolytica* mediante ELISA; en este estudio, las muestras fueron procesadas por la técnica de concentración formol-éter y se observaron por microscopía para buscar quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar*, de las 140 muestras analizadas 23 fueron positivas mediante microscopía para el complejo, con la detección de la adhesina se encontraron 2 muestras positivas para *E. histolytica* de las 23 positivas para el complejo *E. histolytica/E. dispar* [31].

Por otra parte, el impacto epidemiológico apoya la importancia de conocer el efecto en la salud y el desarrollo cognitivo de la población vulnerable como lo es la infantil frente a infecciones con geohelmintos; por ello, es importante describir los patrones de infección por una o más especies en estos individuos. Como claro ejemplo, se aplicó una encuesta en niños de la escuela del distrito de Busia, en Kenia; basado en un diseño transversal usando una muestra seleccionada aleatoriamente entre 1738 niños en edad escolar de 8 a 20 años. Como resultado, en general el 91,7% de los niños estaban infectados con anquilostomas, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* o *Schistosoma mansoni*. La prevalencia de infección de cada especie varió considerablemente entre las escuelas las cuales diferían en la zona geográfica localizada, el hallazgo muestra infecciones marcadas con *S. mansoni*, donde las escuelas se ubicaban a orillas de una fuente hídrica (lago) del sector, los niños fueron típicamente infectados con dos o más especies de helmintos, lo que confirma el buen sentido del planteamiento escolar adoptado por el programa de control en dicho país. El estudio también muestra que existe una asociación entre la infección concurrente y la intensidad de la infección, lo cual puede tener consecuencias para la nutrición y la educación de la población infantil [97].

Puntualmente; con respecto a infecciones entre las especies *T. trichiura – T. suis*, se considera que están estrechamente relacionadas, pero genéticamente son diferentes, solo se pueden distinguir mediante pruebas moleculares, con el uso de marcadores como el ITS se ha determinado infecciones en humanos con *T. suis* en regiones endémicas reafirmando el potencial zoonótico que tienen estas especies [76].

En cuanto a *A. lumbricoides*, el uso del marcador ITS1, ha permitido identificar 5 genotipos *Ascaris* (G1-G5) presente en infecciones en humanos y 3 genotipos (G1-G3) presentes en cerdos. El genotipo G1 con mayor frecuencia parasita a humanos, mientras que G3 es el genotipo predominante en cerdos. Los otros tres genotipos encontrados en infecciones en hospedero humano se encuentran en menor proporción G2, G4 y G5, y de igual manera con baja frecuencia en las infecciones en cerdos está el genotipo G2. Recientemente, un estudio de Brasil basado en este marcador, describió un nuevo genotipo G6 en humanos. Sin embargo, poca información sobre patrones genéticos de la población de *Ascaris* se conoce, por tanto la diversidad genética y su relación filogenética con la población mundial de *Ascaris* circulante es aun poco conocida [71], aunque con el aumento en los el análisis

de secuencias para el marcador ITS1, se permite fortalecer los datos de los posibles genotipos y sus frecuencias.

En los estudios realizados para la diferenciación de Uncinarias: *A. duodenale – N. americanus*, estas especies generalmente no se pueden identificar entre sí mediante métodos convencionales al observar los huevos en microscopía, debido a que son iguales para las dos especies, por lo cual se ve la importancia de implementar una técnica como la qPCR para poder diferenciarlas [81].

En análisis de muestras de materia fecal, que buscan identificar frecuencia de parásitos intestinales presentes en zonas geográficas específicas, brinda información sobre los parásitos prevalentes en una región, un trabajo realizado en Putumayo-Colombia, en un tiempo comprendido entre enero y diciembre de 2000. Seleccionaron 1.905 registros cuyo análisis arrojó una frecuencia de parasitismo intestinal de 70,5%. Entre los agentes causales se reportaron: *E. histolytica* 45,7%; *G. duodenalis* 18,1%; uncinaria sp10,1%; *T. trichiura* 9,5%; *A. lumbricoides* 7,2%; *S. stercoralis* 3,6% y con menor proporción *Tenias* 0,2% y *Enterobius vermicularis* 0,1%. Encontrándose también una frecuencia de poliparasitismo del 29,8%. En conclusión, la zona estudiada presenta frecuencias de parasitismo superiores a las encontradas en un estudio nacional similar a este y a las reportadas en otros países. Los grupos de edad más afectados fueron los mayores de 60 años, los escolares y los preescolares [98]

En población indígena, reconocida a nivel mundial como grupos vulnerables; los trabajos desarrollados buscan describir las frecuencias de parásitos intestinales en diferentes zonas geográficas en las cuales se ubiquen, dado que los factores que predisponen o favorecen dichas infecciones varían de un lugar a otro influyendo directamente sobre sus pobladores. Uno de estos trabajos es el realizado en la Amazonia Brasilera, en Baré y Baniwa. Se analizaron muestras de heces de 270 individuos, utilizando el método de Richie y sedimentación. Como resultados, todos los individuos presentaron infección por protozoos y/o helmintos. Los parásitos más frecuentes en los indígenas fueron *A.lumbricoides* 73%, *Complejo E.histolytica/E.dispar* 53%, y *G. duodenalis* 48% [99].

En este proyecto entonces, se identificó las especies presentes en muestras de materia fecal y se realizó la comparación de los resultados obtenidos mediante microscopia y una prueba molecular PCR en tiempo real, y así proporcionar datos que permiten conocer las diferentes especies presentes en comunidades indígenas, como *G. duodenalis, E. histolytica, E. dispar, E. moskovskii, Cryptosporidium* spp*, Blastocystis* sp*, A. lumbricoides, A. duodenale, N. americanus y T. trichiura*, que son los parásitos más prevalentes en población infantil siendo uno de los grupos más vulnerables en el país. En cuanto a su identificación, y a su vez al conocer los genotipos de alguno de estos parásitos pueden reflejar el potencial zoonótico presentes en una población; lo cual servirá para re plantear o evaluar los métodos de control de estas infecciones parasitarias, implementados para la salud humana y animal [100].

5. Capítulo 5: Planteamiento del problema

5.1 Pregunta de investigación

¿El grado de concordancia entre el método de microscopía y q PCR para la identificación de parásitos intestinales empleadas para el diagnóstico de parásitos intestinales; identificar la frecuencia de parásito intestinales y las subpoblaciones parasitarias presentes en niños menores de 15 años de una comunidad indígena del Amazonas?

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo general

Realizar la comparación de resultados por microscopía vs. qPCR y caracterizar las subpoblaciones de parásitos intestinales en muestras de materia fecal en niños menores de 15 años en una comunidad indígena del Amazonas (Colombia).

5.2.2 Objetivos específicos

- Realizar la identificación de los parásitos intestinales: *Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii, Giardia duodenalis, Cryptosporidium, Blastocystis hominis, Ascaris lumbricoides, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Trichuris trichiura*; mediante q PCR.
- Comparar los resultados obtenidos mediante microscopía vs. los obtenidos con la qPCR mediante un análisis de concordancia para la identificación de parásitos intestinales en muestras de materia fecal.
- Realizar la caracterización molecular de (*Entamobea, Giardia duodenalis, Cryptosporidium, Blastocystis, Ascaris lumbricoides, Ancylostoma duodenale, Necator americanus y Trichuris trichiura*) para la posterior secuenciación y obtención de las subpoblaciones parasitarias.

6. Capítulo 6: Marco metodológico

6.1 Tipo de Estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo de corte transversal, el cual hace parte de un macro proyecto desarrollado por el departamento de Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia.

El desarrollo del proyecto mencionado anteriormente partió de la necesidad de la comunidad quien contactó a la universidad para realizar el diagnóstico de parasitismo intestinal en menores de 15 años, de las comunidades que decidieron participar voluntariamente en el estudio. La convocatoria se realizó en un foro comunitario donde se explicó el objetivo del trabajo.

Se obtuvieron un total de 300 muestras de materia fecal recolectadas para el proyecto anteriormente mencionado; de las cuáles 284 muestras fueron las destinadas para las pruebas moleculares, éste estudio pretendió entonces determinar la frecuencia de parásitos intestinales en la población muestreada, identificar las subpoblaciones parasitarias presentes en muestras de materia fecal y hacer un análisis de concordancia entre dos técnicas una empleada como diagnóstico (examen directo y kato Katz) y la qPCR.

6.2 Consideraciones éticas

Este estudio es una investigación de riesgo mínimo para los participantes, en el cual se siguieron las normas éticas establecidas por el Ministerio de Salud de Colombia, el Código del menor y la Declaración de Helsinki del año 2013.

Por tratarse de menores de edad se tuvo en cuenta el consentimiento y asentimiento informado para el momento de obtener la muestra. Éste proyecto cuenta con acta de aprobación de comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia N°: 002-012-15 expedida el 12 de febrero del 2015.

6.3 Población de estudio

Menores de 15 años de una comunidad indígena del Amazonas Colombia, pertenecientes a los corregimientos de Puerto Nariño, San Juan del Soco, Villa Andrea y Nuevo Paraíso.

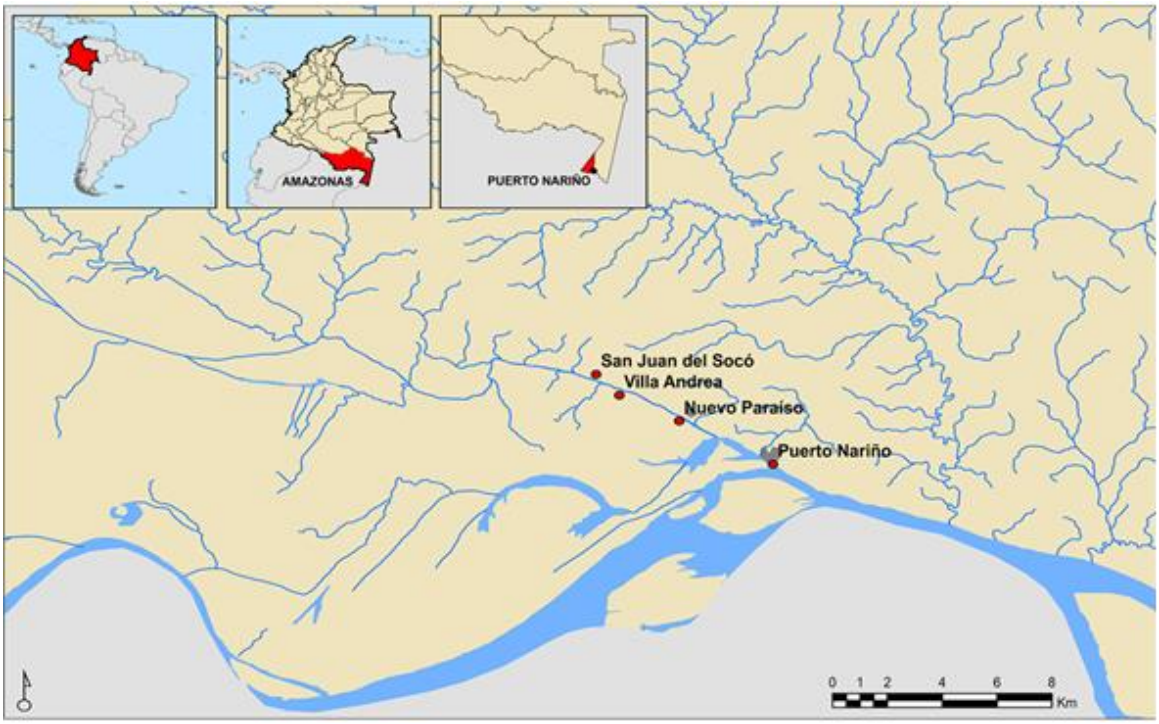

Figura 1 Ubicación geográfica de las comunidades indígenas participantes en el estudio

Las comunidades Nuevo Paraíso, Villa Andrea, San Juan del Socó y la cabecera municipal Puerto Nariño, se encuentran ubicadas sobre la rivera del Río Loretoyacu.

6.4 Recolección y conservación de las muestras

Las muestras fueron recolectadas en los sitios objeto de muestreo (San Juan del Socó, Villa Andrea, Nuevo Paraíso y la cabecera municipal Puerto Nariño), almacenadas en recipientes plásticos y rotulados, transportadas al laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, para el posterior procesamiento.

6.5 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron divididas en dos partes, una parte de la muestra fue fijada en solución fijadora de SAF (Acetato de sodio, Ácido acético y formol), para la identificación de parásitos intestinales mediante los métodos convencionales: examen directo en solución salina y lugol, el método kato-katz para la identificación de geohelmintos y coloración Ziehl-Neelsen (Z-N) modificado para la identificación de *Cryptosporidium* spp.

La segunda parte fue empleada para la identificación de parásitos intestinales mediante la técnica molecular, qPCR, fue fijada en proporción peso-volumen (1:4 materia fecal, es decir 1g de materia fecal y 4 mL. de etanol tipo Biología Molecular al 70%) y fueron almacenadas a -20°C para la extracción de ADN lo cual se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad del Rosario

6.5.1 Extracción de ADN

Con el uso del protocolo sugerido por el fabricante (Kit de extracción para materia fecal Norgen), se obtuvo el aislamiento del ADN de los diferentes microorganismos y células que se encuentran en muestras de materia fecal. Se buscó eliminar los posibles inhibidores presentes en este tipo de muestras utilizando tubos con esferas, combinado fases de homogeneización química, física y de lisis química. Mediante el uso de columnas de centrifugado se purifica adicionalmente el ADN.

La obtención y purificación empleada en este protocolo sugerido por el fabricante Norgen, se basa en la cromatografía de columna de centrifugación utilizando la resina patentada por el fabricante (Norgen), como matriz de separación, la resina que posee la columna de giro se une a los ácidos nucleicos de una manera dependiente de del pH, por lo tanto, sólo el ADN es unido a la columna. [101, 102].

Se extrajo el ADN a partir de 300 µL de muestra suspendida en etanol al 70% de heces utilizando el kit NORGEN Stool DNA Isolation Product # 27600, según las instrucciones del fabricante para todos los parásitos:

Nota: el protocolo sugerido por el fabricante recomienda el uso de 200 mg de materia fecal, en este protocolo se empleó 300 µL debido a que las muestras se encontraban suspendidas en etanol, pero no se realizó un cálculo de equivalencia entre los g. de materia fecal y los µL empleados en este protocolo.

Descripción del procedimiento:

Preparación del Lisado

a) Se tomaron 300 µL de muestra de heces (en etanol al 70%) en un tubo “bead” (con esferas) y se agregaron 10 µL de Plásmido de *Arabidopsis thaliana,* concentración 10 pg./ µL (Cepa 813 del LAMFU)
b) Adicionar 1mL de solución de lisis. Se mezcló con vórtex para homogeneizar la mezcla.
c) Adicione 100 µL de aditivo de lisis y mezcle con vórtex nuevamente.
d) Asegure el tubo y colocar e dsirruptor o el equipo disponible como agitador de esferas. Máxima velocidad por 6 minutos.
e) Centrifugue el tubo a 14.000g (~14.000 RPM) por 3 minutos.
f) Transfiera hasta 600 µL de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga libre de DNAsas (no incluido) de 1,5 mL
g) Añadir 100 µL de solución de enlace, mezclar por inversión el tubo varias veces e incubar durante 10 minutos en hielo.
h) Centrifugue por 3 minutos el lisado para sedimentar los residuos de células.
i) Con una pipeta, transferir hasta 600 µL de sobrenadante (evitando el contacto del pellet con la punta de la pipeta) a un tubo de microcentrífiga de 2 mL libre de DNAsas (No incluido).

   Nota: el protocolo sugerido por el fabricante sugiere 500 µL del sobrenadante, en este protocolo se decidió emplear un volumen de 600 µL sin superar la capacidad del tubo y sin sobrepasar el pellet obtenido.
j) Añadir un volumen igual de etanol al 70% al lisado recolectado (100 µL de etanol por cada 100 µL de lisado). Mezcle con vórtex.

Columna de enlace

a) Armar una columna con uno de los tubos de recolección provistos.
b) Aplicar 600 µL de lisado aclarado con etanol en la columna y centrifugar durante 2 minutos a 14.000 xg (~14.000 RPM). Deseche el exceso de solución y volver a montar la columna de giro con el tubo de recolección.

c) Repetir paso b con el restante de volumen de lisado hasta pasar por completo el volumen obtenido.

Columna de lavado

a) Aplicar 500 µL de solución de lavado a la columna y centrifugar durante 2 minutos.
b) Deseche el exceso de solución y vuelva a montar la columna de giro con su tubo de recolección.
c) Aplicar 500 µL de solución de lavado II a la columna y centrifugue por 2 minutos.
d) Deseche el exceso de solución y vuelva a montar la columna de giro con su tubo de recolección.
e) Repetir los pasos c y d anteriormente mencionados.

Centrifugar la columna durante 3 minutos para que seque completamente la resina. Descarte el tubo colector.

Elución del DNA

a) Colocar la columna de giro en un tubo de elución de 1,7 mL limpio (provisto por el kit).
b) Adicione 50 µL de buffer de elución a la columna.

   Nota: el protocolo del fabricante sugiere 100 µL del buffer de elución pero en este protocolo se realizó dos eluciones cada una a un volumen de 50 µL con el fin de recuperar mayor concentrado de ADN como lo sugiere el fabricante en la nota "Opcional"
c) Centrifugar durante 3 minutos a (~2.000 RPM), seguidos de un centrifugado 2 minutos a (~14.000 RPM). Tenga en cuenta el volumen de elución de la columna. Si la totalidad de volumen no se ha eluído, centrifugar la columna a (~14.000 RPM) durante 1 minuto adicional.

   Nota: el protocolo sugerido por el fabricante recomienda 1.000 RPM, en este protocolo se estandarizó para 2.000 RMP

Opcional: Una elución adicional se puede realizar si se desea repitiendo los pasos b y c utilizando 50 µL de buffer de elución. El rendimiento total se puede mejorar en un 20-30% adicional cuando se lleva a cabo esta segunda elución.

Almacenamiento del DNA: puede ser almacenado a 2-8°C durante varios días. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda llevar a -20°C.

6.5.2 Detección Molecular de *G. duodenalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium spp*, *Blastocystis sp*, *A. duodenale*, *N. americanus*, *T. trichiura*, *A. lumbricoides*, mediante q PCR

Los iniciadores específicos para cada patógeno y sondas TaqMan marcadas con FAM (Applied Biosystems, Foster City, CA). En la siguiente tabla se enlistan las secuencias de los primers y sondas empleados, tomados de Mejía et al., 2013 [22]. En el caso de *Blastocystis* se empelaron los primers y sondas referenciados por Stensnvold 2012 [103].

Tabla 3 Secuencia de primers empleados para la identificación de parásitos intestinales por qPCR

Microorganismo para el que se diseñó	Nombre del primer	Gen al que va dirigido	Secuencia (5'- 3')	Tamaño del producto
Giardia duodenalis	*Giardia* Fwd	18s	CATGCATGCCCGCTCA	88pb
	Giardia Rv		AGCGGTGTCCGGCTAGC	
***Blastocystis* sp**	*Blastocystis* Fwd	18s	GGTCCGGTGAACACTTTGGATTT	119 pb
	Blastocystis Rv		CCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCA	
Crypstosporidium parvum/hominis	*Cryptosporidium* Fwd	DNA J like-protein	AACTTCACGTGTGTTTGCCAAT	72 pb
	Cryptosporidium Rv		CCAATCACAGAATCATCAGAATCG	
Entamoeba histolytica	*E. histolytica* Fwd	18s	GTTTGTATTAGTACAAAATGGCCAATTC	76pb
	E. histolytica Rv		TCGTGGCATCCTAACTCACTTAGA	
Ascaris lumbricoides	*A. lumbricoides* Fwd	ITS 1	TGCACATAAGTACTATTTGCGCGTAT	82 pb
	A. lumbricoides Rv		CCGCCGACTGCTATTACATCA	
Trichuris trichiura	*Trichuris* Fwd	ITS 1	TCCGAACGGCGGATCA	56 pb
	Trichuris Rv		CTCGAGTGTCACGTCGTCCTT	
Ancylostoma duodenalis	*Ancylostoma* Fwd	ITS 2	GAATGACAGCAAACTCGTTGTTG	71 pb
	Ancylostoma Rv		ATACTAGCCACTGCCGAAACGT	
Necator americanus	*Necator* Fwd	ITS 2	CTGTTTGTCGAACGGTACTTGC	101 pb
	Necator Rv		ATAACAGCGTGCACATGTTGC	

Tabla 4. Secuencia de sondas empleadas para la identificación de parásitos intestinales por qPCR

Microorganismo para el que se diseñó	Nombre del primer	Gen al que va dirigido	Secuencia (5'- 3')
Giardia duodenalis	*Giardia* Fwd	16s	AGGACAACGGTTGCAC
***Blastocystis* sp**	*Blastocystis* Fwd	18s	
Crypstosporidium parvum/hominis	*Cryptosporidium* Fwd	DNA J like-protein	CATATGAAGTTATAGGGATACCA G
Entamoeba histolytica	*E. histolytica* Fwd	18s	CAATGAATTGAGAAATGACA
Ascaris lumbricoides	*A. lumbricoides* Fwd	ITS 1	GAGCCACATAGTAAATT
Trichuris trichiura	*Trichuris* Fwd	ITS 1	TTGGCTCGTAGGTCGTT
Ancylostoma dodenalis	*Ancylostoma* Fwd	ITS 2	ATCGTTTACCGACTTTAG
Necator americanus	*Necator* Fwd	ITS 2	CTGTACTACGCATTGTATAC

Tabla 5 Lista de controles empleados para la identificación de parásitos intestinales en qPCR

	Control	Objetivo	Procedencia	Descripción
1	*Giardia duodenalis*	Control positivo	Cepa de referencia WB	ADN obtenido a partir de cultivos axénicos en medio TYS-33 WB London School of Hygiene and Tropical Medicine
2	*Blastocystis*	Control positivo	Cultivo mixto	a partir de muestras de materia fecal positivas por microscopía
3	*Crypstosporidium*	Control positivo	ADN de referencia	Donación Universidad de Galventon
4	*E. histolytica*	Control positivo	Cepa de referencia HM1	ADN obtenido a partir de cultivos axénicos en medio TYS-33 London School of Hygiene and Tropical Medicine
5	*E. dispar*	Control positivo	Cepa de referencia SAW760	ADN obtenido a partir de cultivos axénicos en medio TYS-33 London School of Hygiene and Tropical Medicine
6	*E. moshkovskii*	Control positivo	Cepa de referencia	ADN obtenido a partir de cultivos axénicos en medio TYS-33 London School of Hygiene and Tropical Medicine
7	*Ascaris lumbricoides*	Control positivo	ADN de muestra positiva	Muestras de materia fecal positivas obtenidas del estudio mediante kato katz
8	*Trichuris trichiura*	Control positivo	ADN de muestra positiva	Muestras de materia fecal positivas obtenidas del estudio mediante kato katz
9	*Ancylostoma dodenalis*	Control positivo	ADN de muestra positiva	Muestras de materia fecal positivas obtenidas del estudio mediante kato katz
10	*Necator americanus*	Control posittivo	ADN de muestra	Muestra de materia fecal positiva mediante Kato katz
11	*Arabidopsis thaliana*	Control interno	Control interno de amplificación ADN Plasmídico	Recombinante lineal que contiene un fragmento que codifica para una acuaporina, la cual no presenta identidad con ADN parasitario y ADN humano
12	*Control Negativo*	Control negativo	ADN de muestras negativas	ADN obtenido a partir de materia fecal negativas mediante examen directo y kato katz

Nota: Se realizó control negativo de la extracción, un control negativo proveniente de muestras de materia fecal negativas por los dos métodos empleados para diagnóstico (examen directo y kato Katz) y un control negativo por cada placa de q PCR como control negativo de reacción el cual se empleó Buffer de elusión.

Para el montaje de PCR en tiempo real. Se emplea el sistema TagMan para la qPCRs, en placas de 96 pozos MicroAmp (Applied Biosystems) y la enzima Taqman Mastermix ™

a) Colocar la cabina en UV 15 minutos antes de iniciar
b) Colocar a temperatura ambiente los reactivos a usar (Primers, sondas y Máster mix).
c) Antes de iniciar realizar los cálculos de volumen a preparar para la mezcla de acuerdo al número de reacciones

A continuación, se muestra en la siguiente tabla la relación de reactivos empleados para la preparación de la mezcla para la qPCR, se recomienda realizar la mezcla en el orden que se enlista cada reactivo

Tabla 6. Preparación de pre mezcla para qPCR

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (uL)	Concentración
Agua	---	0,3	--
Master mix Roche	--	3,5	--
Primer Fwr	10 µM	1,0	10 µM
Primer Rv	10 µM	1,0	10 µM
Primer IAC Fwr	10 µM	0.4	4 µM
Primer IAC Rv	10 µM	0.4	4 µM
Sonda	5 µM	0.2	1 µM
Sonda IAC	5 µM	0.2	1 µM
Volumen Final		7 µL	30 µM

MONTAJE DE LA PLACA Y LAS MUESTRAS

Procedimiento

a) Proteger la placa de la luz, pasar a zona de amplificación
b) Tomar los ADNs provenientes de las muestras y mezclar con vortex durante 15 segundos y spin.
c) Añadir 2 µL de la muestra de ADN a analizar y de los controles respectivos (control positivo, control negativo de extracción, control negativo muestra negativa, control negativo de reacción).
d) Cubrir la placa con un film para placas.
e) Centrifugar la placa para concentrar la mezcla de reacción en el fondo del tubo.
f) Las muestras fueron procesadas en el equipo Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con el siguiente perfil térmico y los ciclos de corrida, descritos en la siguiente tabla

Tabla 7 Perfil térmico empleado para qPCR

	Temperatura	**Tiempo**
Primer paso	50°C	2min.
Segundo paso	95°C	10min.
Tercer paso: 40 ciclos	95°C	15seg.
	58°C	1min.

Nota: se empleó la anterior mezcla y perfil térmico para todos los parásitos blanco del estudio

6.5.3 Detección molecular de *E. dispar* y *E. moshkovskii* mediante PCR convencional

En primera instancia se intentó realizar un qPCR multiplex para la identificación el Complejo (*E. histolytica, E. dispar y E. moshkovskii*), después de varios ensayos se evidenció un problema en las sondas, puesto que al realizar una PCR se obtenían bandas de los controles positivos, determinando que el problema eran las sondas, pero no se determinó cual fue el inconveniente. Por tal motivo solo se realizó la identificación de *E. hisolytica* por qPCR; para el caso de *E. dispar y E. moshkovskii* fue mediante PCR convencional con el blanco molecular 18s, las condiciones y los primers empleados para ésta PCR se describen en la tabla 10, el perfil térmico y la mezcla para la PCR se describen en las tablas 8 y 10 respectivamente [30, 104].

Tabla 8 Mezcla para PCR *Entamoba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*

Reactivo	**Concentración Inicial**	**Volumen (uL)**	**Concentración**
Agua	---	7,0	--
Master mix Green	2x	12,5	1x
Primer Fwr	10 µM	1,25	12,5 µM
Primer Rv	10 µM	1,25	12,5 µM
ADN	---	3,0	---
Volumen Final	---	25 µL	25 µM

Tabla 9 Secuencia de Primers empleados para la PCR de *Entamoebas*

# de Primer	**Microorganismo para el que se diseñó**	**Nombre del primer**	**Tamaño del producto**	**Secuencia (5'- 3')**
1	*Entamoeba*	EntaF	166 pb	5'-GAG CAC AGC ATG AGC GAA AT-3 '
2	*Entamoeba dispar*	EdR	752 pb	5'-CAC CAC TCC CTA CTA TTA DC-3
3	*Entamoeba moshkovskii*	EmR	580 pb	5'-TGA GCC CCA GAG GAG ACA T-3'

Tabla 10 Perfil térmico para la PCR de *Entamoebas*

	Temperatura	**Tiempo**
Primer paso	95°C	5 min.
Segundo paso	94°C	1 min.
Tercer paso	58°C	1 min.
Cuarto paso (30 ciclos)	72°C	1min.
Quinto paso	72°C	10 min.

Los productos de amplificación fueron revelados en gel de agarosa 2%, 40 µL de Buffer 1x más 0,8 g de Agarosa y 1 µL de Syber, corrido en cámara de electroforesis 100vw por 20 minutos

6.6 Caracterización molecular

Como criterio de inclusión, para la caracterización molecular, se tuvieron en cuenta aquellas muestras positivas obtenidas por PCR en tiempo real para *Giardia*, *Blastocystis* sp y *Cryptosporidium* spp. Cualquier muestra positiva se sometió a PCR convencional para obtener productos de amplificación usando los primers de los siguientes marcadores moleculares que se ilustran en la tabla 11: *gdh* (Glutamato deshidrogenasa)[105] y *tpi* (triosa fosfato isomerasa) [105] para la identificación de ensamblajes de *Giardia*. En el caso de *Blastocystis*, se realizó la amplificación de ARNr de SSU, para identificar los ST y alelos de *Blastocystis* [106]. En el caso de *Cryptosporidium*, se realizó en laboratorio PCR para la identificación de especies mediante el uso de una subunidad rRNA [107] y para los subtipos se empleó el gen GP60 [108], se compararon las secuencias con las especies y las secuencias de control de subtipos en CDC, Atlanta.

Tabla 11. Marcadores moleculares para la identificación de parásitos intestinales

Parasito	Marcador molecular	Secuencias	Referencia	No. Genotipo /especie
Blastocystis sp	18 S	RD5 (5'-ATCTGGTTGATCCTGTCCAG-3') BhRDr (5'-GAGTGCCTTTTT AACAACAAC G -3')	[106]	STs
G. duodenalis	GDH TPI	GDHeF (5'-TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT-3') GDHiF (5'-CAGTACAACTCYGCTCTCGG-3') GDHiR (5'-GTTRTCCTTGCACATCTCC-3') AL3543 (5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3') AL3546 (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3') AL3544 (5'-CCCTTCATCGGIGGTAACTT-3') AL3545 (5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3')	[105]	Ensamblaje

Nota: los marcadores moleculares descritos en la anterior tabla son diferentes para *G. duodenalis*, los primers usados para qPCR son los sugeridos por Mejía y colaboradores en el 2013.

6.6.1 PCR blanco molecular GDH y TPI para *Giardia duodenalis*

PCR anidada para la obtención de productos de amplificación del marcador GDH y TPI para *Giardia duodenalis*

Tabla 12 Mezcla para PCR para la caracterización molecular de *Giardia duodenalis*

Reactivo	**Concentración Inicial**	**Volumen (uL)**	**Concentración**
Agua	---	6,5	--
Master mix Green	2x	12,5	1x
Primer Fwr	10 µM	2,0	20 µM
Primer Rv	10 µM	2,0	20 µM
ADN	---	2,0	---
Volumen Final	---	25 µL	µM

Tabla 13 Perfil térmico, primera y segunda parte PCR para la caracterización molecular de *Giardia duodenalis* con el marcador *(gdh)*

	Temperatura 1ª. parte	**Tiempo 1ª. parte**	**Temperatura 2ª. parte**	**Tiempo 2ª. parte**
Primer paso	95°C	10 min.	95°C	10 min.
Segundo paso	95°C	1 min.	95°C	1 min.
Tercer paso	50°C	1 min.	54°c	1 min.
Cuarto paso (35 ciclos)	72°C	1min.	72°C	1 min.
Quinto paso	72°C	10 min.	72°C	10 min.

Tabla 14 Perfil térmico, primera y segunda parte PCR para la caracterización molecular de *Giardia_duodenalis* con el marcador *(tpi)*

	Temperatura 1ª. parte	**Tiempo 1ª. parte**	**Temperatura 2ª. parte**	**Tiempo 2ª. parte**
Primer paso	95°C	10 min.	95°C	10 min.
Segundo paso	94°C	45 seg.	94°C	45 seg.
Tercer paso	50°C	45 seg.	55°c	45 seg.
Cuarto paso (35 ciclos)	72°C	1min. *	72°C	1 min.
Quinto paso	72°C	10 min.	72°C	10 min.

Los productos de amplificación fueron revelados en gel de agarosa 2%, 40 µL de Buffer 1x más 0,8 g de Agarosa y 1 µL de Syber, corrido en cámara de electroforesis 100vw por 20 minutos

6.6.2 PCR para la caracterización molecular de *Blastocystis* con el marcador 18s

PCR para la obtención de productos de amplificación del marcador 18s para *Blastocystis*

Tabla 15 Mezcla para PCR blanco molecular 18s para *Blastocystis*

Reactivo	**Concentración Inicial**	**Volumen (uL)**	**Concentración**
Agua	---	6,5	--
Master mix Green	2x	12,5	1x
Primer Fwr	10 µM	2,0	20
Primer Rv	10 µM	2,0	20
ADN	---	5,0	---
Volumen Final	---	28 µL	

Tabla 16 Perfil térmico para PCR blanco 18s para *Blastocystis* sp

	Temperatura	**Tiempo**
Primer paso	95°C	10 min.
Segundo paso	94°C	1 min.
Tercer paso	59°C	1 min.
Cuarto paso (35 ciclos)	72°C	1min.
Quinto paso	72°C	10 min.

Los productos de amplificación fueron revelados en gel de agarosa 2%, 40 µL de Buffer 1x más 0,8 g de Agarosa y 1 µL de Syber, corrido en cámara de electroforesis 100vw por 20 minutos.

6.6.3 Análisis y secuenciación

Los productos de amplificación para *Giardia y Blastocystis* fueron enviados a secuenciar a MacroGen, mediante el método de Sanger en un analizador genético 310 (Applied Biosystems), las secuencias obtenidas fueron corregidas y alineadas en MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) y comparadas con secuencias de referencia por BLAST. Además, para *Blastocystis*, las consultas se realizaron en la base de datos disponible para la obtención de alelos y ST (http://pubmlst.org/blastocystis/). La reconstrucción filogenética para asignar el ensamblaje al grupo de secuencias de *G. duodenalis,* se realizó utilizando Máxima Verosimilitud con 1000 repeticiones bootstrap con secuencias de referencia contenidas en GenBank con los siguientes números de acceso: AI (M84604), AII (AY178737), BIII (AF069059), BIV (AY178739), C (U60982), D (AY178741), E (AB182127), F (AB569384), G (AF069058), G (AY178745), H (GU176089) y out group con *G. microti* (AY228649.1) y *G. ardeae* (AF069060).

6.7 Índices de diversidad genética

Se calcularon los índices de diversidad genética por comunidad a través de los marcadores *gdh* y *tpi* para *Giardia* y 18S rDNA para *Blastocystis*. π (índice de diversidad) y θ los índices de diversidad de nucleótidos diversidad haplotipica se calcularon en DNAsp v.5.0.

6.8 Análisis estadístico

Se utilizaron estadísticas descriptivas para los principales eventos de interés. Las variables categóricas se informan en términos de porcentajes, con los correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95%, calculados utilizando el método bootstrap [109]. En el caso de variables continuas, las medias se calcularon con las correspondientes medidas de dispersión (desviación estándar - SD). Las existencias de asociación entre las variables categóricas se evaluaron utilizando chi-cuadrado o Fisher, como pruebas apropiadas. La distribución obtenida por frecuencia para las mujeres fue 49,2% (n = 128) y 50,8% (n = 132) para los hombres ($p < 0,05$) se consideró estadísticamente significativa. Se evaluó la existencia de asociación entre los principales resultados (datos epidemiológicos y resultados de la infección) utilizando las variables categóricas utilizando las pruebas chi-cuadrado o Fisher, según las características de los datos. En el caso de la edad de los individuos, fue necesario clasificar la variable considerando los percentiles de distribución obteniendo cuatro grupos de 1 a 4 años, 5 a 8 años, de 9 a 12 años y uno finalmente mayor o igual a 13 años.

En primer lugar, se obtuvo la frecuencia de infección por grupo de edad, sexo y comunidad. Una vez identificada la frecuencia y distribución de la infección en cada comunidad se realizaron análisis bivariados para determinar la existencia de asociación entre infecciones parasitarias y factores sociodemográficos (edad, género y comunidad) de individuos infectados. Se identificaron las asociaciones entre los resultados de la infección (incluidos los índices de diversidad genética (*tpi, gdh* y 18S) dentro de los grupos del mismo sexo o de la misma edad por comunidad, empleando pruebas de chi-cuadrado o Fisher.

La distribución de ensamblajes de *G. duodenalis* y STs de *Blastocystis* sp*,* se realizaron análisis descriptivos y se desarrollaron pruebas de asociación de acuerdo con la prueba anteriormente mencionada, con el objetivo de comparar con cada factor demográfico,

procediéndose también para los STs presentes en *Blastocystis*. El grado de significación con STs y alelos pertenecientes a él se enfrentaron con cada variable para encontrar algún grado de asociación entre un alelo particular en las poblaciones. La diferencia en los índices de diversidad genética fue evaluada a través de pruebas de comparación entre muestras independientes, considerando los resultados de cada comunidad. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ era estadísticamente significativo para todas las pruebas de hipótesis. El análisis estadístico se realizó utilizando STATA versión 10.1 (Stata Corp, College Station, TX).

7. Capítulo 7: Resultados

7.1 Resultados Objetivo 1

En general, de acuerdo a las frecuencias totales de parásitos intestinales encontradas en las cuatro comunidades, presentan la siguiente distribución.

7.1.1 Frecuencia de parásitos intestinales

Un total de 261 muestras fueron analizadas por microscopía y qPCR. En general, para las muestras de heces recogidas en la población escolar de las cuatro comunidades indígenas la frecuencia de infección en total para las dos técnicas empleadas fue en primer lugar para los protozoarios *Blastocystis* sp 92% (n=240), seguido de *G.duodenalis* 67,1% (n=175), para el caso del complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* la frecuencia fue del 20,7% de los cuales el 7,3% (n=19) corresponde por qPCR a *E. histolytica* (Tabla 17 y 18). Para el caso de los helmintos, la frecuencia de infección fue en primer lugar de *T.trichiura* con 70,1% (n= 183), seguido de *A. lumbricoides* 59,4% (n=155), en tercer lugar, se encuentran las Uncinarias, *N. americanus* 51% (n=133) y *A. duodenale* 5,0% (n=13). Con respecto a sexo y edad y la frecuencia de infección, en hombres es más frecuente *N. americanus*, en mujeres *A. lumbricoides*, en niños menores de 7 años se encuentra *T. trichiura* y en mayores de 8 años encontramos más frecuente *A.doudenale*. (Tabla 17)

En el momento de realizar la comparación de las frecuencias encontradas con cada una de las técnicas, se observó una discrepancia en la frecuencia frente a *T. trichiura*, se realizó una revisión del protocolo de extracción, para lo cual se realizaron montajes en directo del lisado y se encontraron huevos tanto de *Ascaris, Trichuris* y en menor proporción de Uncinarias sp (Figura 2)

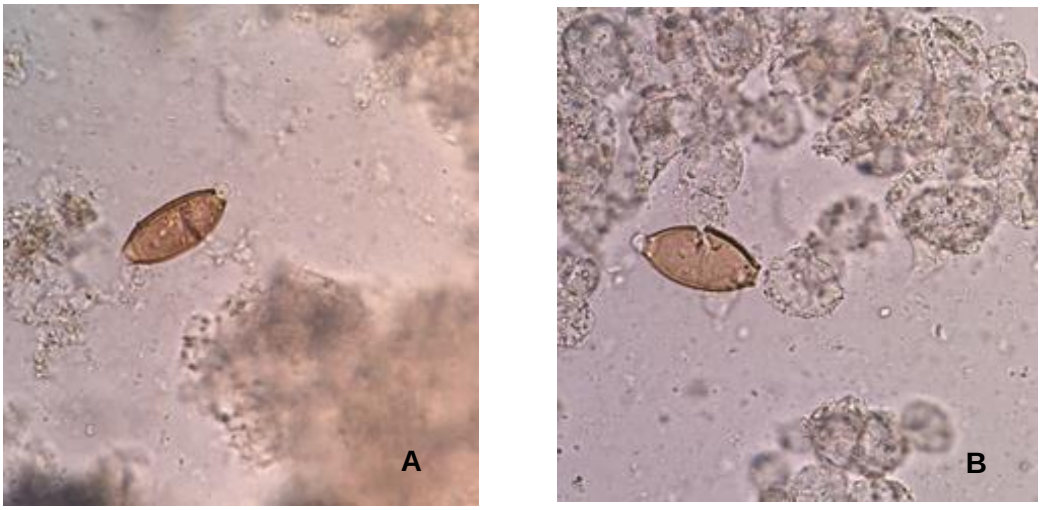

Figura 2 Huevos de *Trichuris* después de realizar la primera fase de lisis (protocolo de extracción)

A. Fotografía de huevo de *Trichuris* siguiendo el protocolo de extracción sugerido por el fabricante

B. Fotografía de huevo de *Trichuris* realizando modificaciones al protocolo de extracción empleado para el estudio, después de realizar 3 ciclos con choque térmico de 65°C e incubación en hielo y fragmentación física con disrruptor, se empieza a observar la fragmentación de algunos huevos.

Tabla 17 Frecuencia total de helmintos y protozoos intestinales entre 261 participantes de cuatro municipios de Colombia después de tamizar las muestras con examen directo y PCR, estratificadas por género y grupo de edad.

		Frecuencia			Género			Edad (años)		
	Parásitos	% (n)	IC 95%	Patogénico	Mujer	Hombre	P	1 - 7	8 - 19	P
Helmintos	*Ascaris lumbricoides*	59,4 (155)	53,1 – 65,4	Si	46,8	53,2	0,335	48,4	51,6	0,040
	Trichuris trichiura	70,1 (183)	64,1 – 75,6	Si	46,7	53,3	0,213	49,2	50,8	0,027
	Ancylostoma duodenale	5,0 (13)	2,6 – 8,3	Si	46,2	53,8	0,820	38,5	61,5	0,029
	Necator americanus	51,0 (133)	44,7 – 57,2	Si	40,9	59,1	0,006	46,6	53,4	0,020
Protozoos	*Blastocystis* sp.	92,0 (240)	87,9 – 94,9	No	48,9	51,1	0,763	52,1	47,9	0,089
	Entamoeba histolytica	7,3 (19)	4,4 – 11,1	Si	36,8	63,2	0,262	21,0	79,0	0,003
	Entamoeba histolytica/E. dispar	20,7 (54)	15,9 – 26,1	Si/No	63,0	37,0	0,023	35,2	64,8	0,002
	Giardia duodenalis	67,1 (175)	60,9 – 72,7	Si	48,3	51,7	0,661	56,1	46,3	0,272

Tabla 18 Frecuencia de infecciones por helmintos y protozoos intestinales en 4 municipios de Colombia de acuerdo al examen directo y PCR

	Parásitos	Todas las técnicas			qPCR			Microscopía			Kappa	
		n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	Valor	IC 95%
Helmintos	*Ascaris lumbricoides*	155	59,4	53,1 – 65,4	138	52,3	46,6 – 59,1	120	46,0	39,8 – 52,2	0,60	(0,54 -0,66)
	Trichuris trichiura	183	70,1	64,1 – 75,6	127	48,7	42,4 – 54,9	161	61,7	55,5 – 67,7	0,41	(0,36 – 0,47)
	Uncinaria	-	-	-	-	-	-	58	22,2	17,3 – 27,8	-	-
	Ancylostoma duodenale	13	5,0	2,6 – 8,3	13	5,0	2,6 – 8,3	0	0	0	-	-
	Necator americanus	133	51,0	44,7 – 57,2	133	51,0	44,7 – 57,2	0	0	0	-	-
Protozoos intestinales	*Blastocystis* sp.	240	92,0	87,9 – 94,9	234	89,7	85,3 – 93,1	92	35,3	29,4 – 41,4	0,04	(0,02 – 0,07)
	E. histolytica	19	7,3	4,4 – 11,1	19	7,3	4,4 – 11,1	0	0	0	-	-
	Complejo E. histolytica/E. dispar/E.moshkovskii	54	20,7	15,9 – 26,1	-	-	-	54	21,0	15,9 – 26,1	-	-
	Giardia duodenalis	175	67,1	60,9 – 72,7	172	65,9	59,8 – 71,6	62	23,8	18,7 – 29,4	0,24	(0,19 – 0,28)

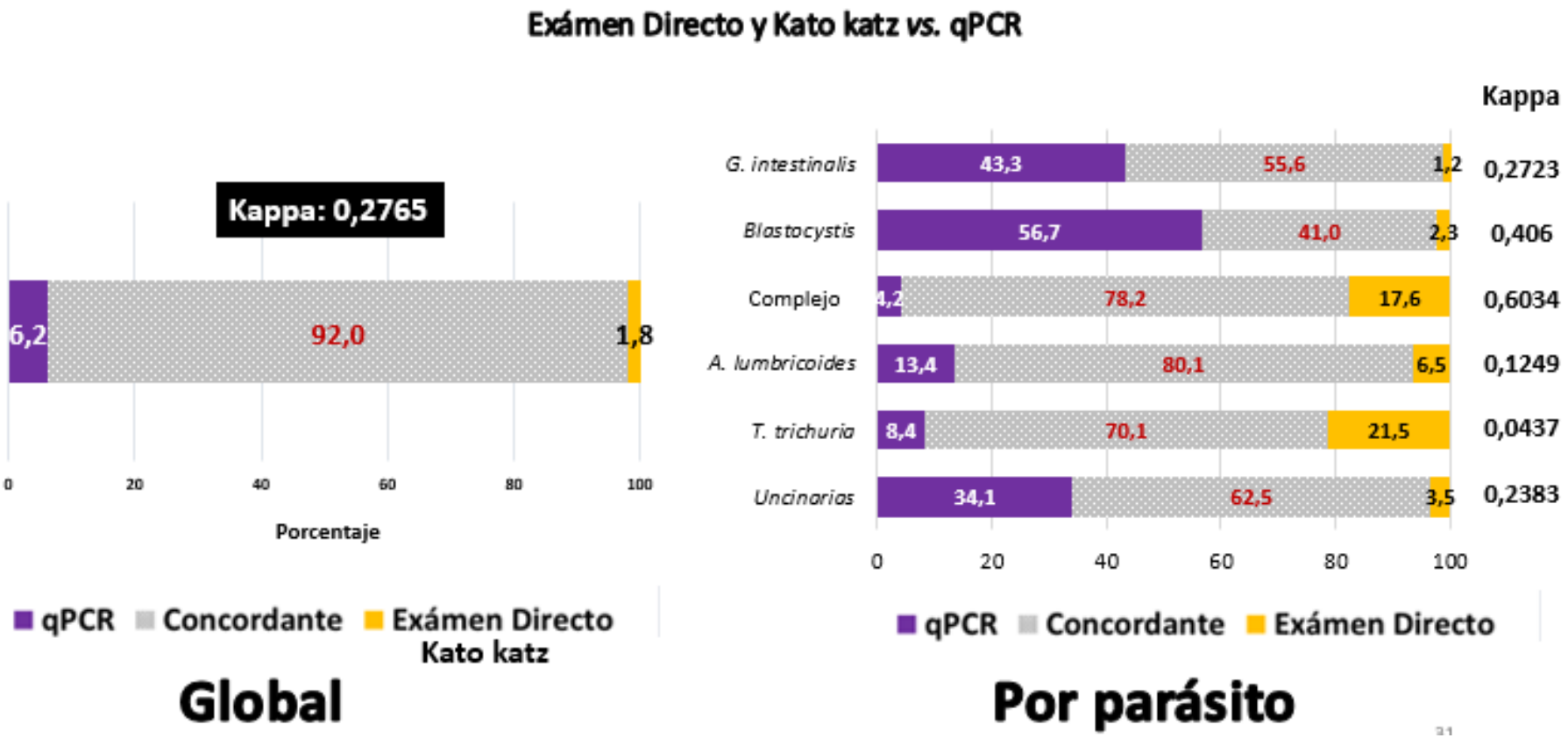

Figura 3 Análisis de concordancia e índice Kappa entre las técnicas empleadas para la identificación de parásitos intestinales

7.2 Resultados Objetivo 2 (análisis de concordancia entre microscopía vs. qPCR)

En el momento de determinar el índice Kappa, se revisó el comportamiento frente a la positividad de las muestras con cada una de las técnicas empleadas, en este caso examen directo, kato katz y la qPCR.

Ahora las comparaciones, permiten determinar que existe una correlación débil entre las dos técnicas microscopía (montaje directo y kato katz) y qPCR, debido esto a la alta frecuencia obtenida con la técnica molecular para algunos de los parásitos; por el contrario, ocurre con los helmintos *Ascaris* y *Trichuris* puesto que no hubo una gran diferencia entre las frecuencias obtenidas con las dos técnicas microscopía (kato-katz) y qPCR, adicional con las discrepancias entre los datos de positivad para el caso puntual de *Trichuris* (Tabla 18 y Figura 3)

7.3 Resultados Objetivo 3 (genotipificación)

A continuación, se relacionan los datos obtenidos con respecto a la genotipificación realizada para los protozoarios *Giardia duodenalis* (Figura 4), *Blastocystis* sp (Figura 5)

7.3.1 Frecuencia de la infección por *G. duodenalis*

Para la PCR en tiempo real, 184 muestras (64,8%, IC: 58,9-70,3) fueron positivas, observándose el porcentaje de infección más alto para Villa Andrea (74,4%) y San Juan del Socó (65,0%), seguido por Puerto Nariño 62,3%) y Nuevo Paraíso (61,3%). No hubo asociación significativa entre la frecuencia de infección y las comunidades. A través de las muestras positivas, 120 secuencias fueron analizadas con *gdh* encontrando el ensamblaje AI, BIII y BIV que muestran una asociación significativa entre las comunidades (Tabla 27). El ensamblaje más común fue AI (61%) (Tabla 20), más frecuente en la comunidad de San Juan del Socó (40,4%), siendo el segundo ensamblaje más común BIII (17,2%) con mayor frecuencia en la comunidad de Villa Andrea (34,4%). El marcador *tpi* mostró la presencia de los cuatro ensamblajes AI, AII, BIII y BIV, para los cuales el ensamblaje más frecuente fue BIII (59,6%) (Tabla 20), más frecuente en la comunidad de Villa Andrea (28,1%) seguido por AI (4,9%) con mayor frecuencia en la comunidad de Nuevo Paraíso (16,7%).

No se encontró ninguna asociación significativa entre los ensamblajes y las comunidades con los marcadores empleados. Además, el grado de asociación entre los dos marcadores utilizados para el genotipo (*gdh* y *tpi*) no mostró asociación entre los dos marcadores (p = 0,135).

7.3.2 Asociaciones entre variables sociodemográficas y conjuntos de *G. duodenalis*

La distribución de los ensamblajes con *gdh* identificadas para los grupos de edad evaluados mostró una asociación significativa y al evaluar las variables independientes se encontró que sólo el ensamblaje AI tenía una asociación siendo más frecuentemente detectada en niños de 9 a 12 años (34,4%). No se encontraron asociaciones significativas entre los métodos diagnósticos y las comunidades, pero cuando se comparó la distribución de las asociaciones con las comunidades se encontró una asociación y comparando las variables de manera independiente se confirmó la asociación significativa entre el ensamblaje BIII y la comunidad de Villa Andrea con una tasa positiva del 34,4% (Tabla 21). En el caso del marcador de *tpi*, no se observó asociación entre los grupos de edad, género y comunidades.

7.3.3 Frecuencia de la infección por *Blastocystis*, STs y alelos

La PCR en tiempo real mostró 252 muestras positivas (88,7%, IC: 84,5-92,2) en un total de 284 muestras y con mayor frecuencia en la comunidad de Nuevo Paraíso (93,5%), seguida de Villa Andrea (90,7%), Puerto Nariño (87,8%) y San Juan del Socó (87,5%) (Figura 5). Se analizaron un total de 204 secuencias a partir de los productos amplificados con el ARNr 18S observando ST3 (34,5%), ST2 (30,5%) y ST1 (29,6%) (Tabla 20). Estos STs fueron más frecuentes en San Juan del Socó (35,2% y 29,6%) respectivamente. Además, se encontró ST 6 (0,9%) en la comunidad de Puerto Nariño y ST4 en Nuevo Paraíso (6,9%), Puerto Nariño (2,6%) y San Juan del Socó 1,4%. Posteriormente, se identificaron los alelos presentes en cada ST, donde el alelo 4 pertenecientes a ST1 fue el más común seguido por el alelo 34 de ST3. En cuanto a las infecciones mixtas, se detectó un total de 13,3% (n = 27) observando infección mixta entre el ST1 con ST2, ST3, ST4 y ST5.

7.3.4 Asociaciones entre variables sociodemográficas, STs y alelos de *Blastocystis* sp

Para evaluar la distribución de STs identificados para los grupos de edad, se encontró que ST1 fue el único que tuvo una asociación con la edad encontrándose con más frecuencia en el grupo de niños menores de 5 años (Tabla 21). Posteriormente, al evaluar cuál de los alelos de este ST es el que tiene más asociación con variables independientes, encontramos que el alelo 4 tiene una asociación estadísticamente significativa entre el grupo de edad menor de 5 años. No se observó asociación significativa entre las variables de sexo y STs y la distribución de alelos. En la realización del análisis entre las frecuencias de los STs y las comunidades, se encontró una asociación donde el ST1 fue el más frecuente con el 12,8% en la comunidad de Puerto Nariño y al evaluar las variables independientemente se encontró que el ST2 y ST3 tienen una asociación significativa, siendo más frecuente en la comunidad de San Juan del Socó. Al analizar las variables de forma independiente, no se encontró asociación significativa entre ellos para cualquiera de los STs.

7.3.5 Frecuencia de *Cryptosporidium* sp, especies y subtipos

De acuerdo a las fallas en la qPCR para la identificación de este microorganismo, teniendo en cuenta desde el diseño de la técnica (primers y sonda) reflejado en la eficiencia, a pesar de estos inconvenientes, se consideraron las 50 muestras obtenidas como positivas con la qPCR para enviar a realizar la PCR para poder identificar si dentro de este grupo se tendría alguna muestra positiva para *Cryptosporidium*, conocer la especie y el subtipo, para el marcador 18s (identificar especies) y con el marcador Gp60 (identificar subtipos). El resultado reportado de las PCR de referencia fueron 5 muestras de las 50 muestras enviadas (ADN de las muestras positivas por qPCR); las especies *C. viatorum* (n = 1), *C. hominis* (n = 2) (con los subtipos IdA19 e IaA12R8) y *C. parvum* (n = 2) (con el subtipo IIcA5G3c). Las 5 muestras pertenecen a la comunidad de Puerto Nariño y sólo se encontró en el sexo femenino, no se realizó ningún análisis estadístico adicional con estos datos debido a que no se consideró someter todas las muestras a la PCR de referencia y el tamaño de las muestras es muy pequeño para llegar asegurar que tan solo sean las 5 muestras reportadas. Esto también es atribuible al pequeño número de muestras positivas

obtenidas para este microorganismo. Se encontraron muestras positivas para *C. hominis y C. parvum* en los grupos de edad de los niños menores de 5 años y *C. viatorum* en un niño perteneciente al grupo etario de entre 5 y 8 años.

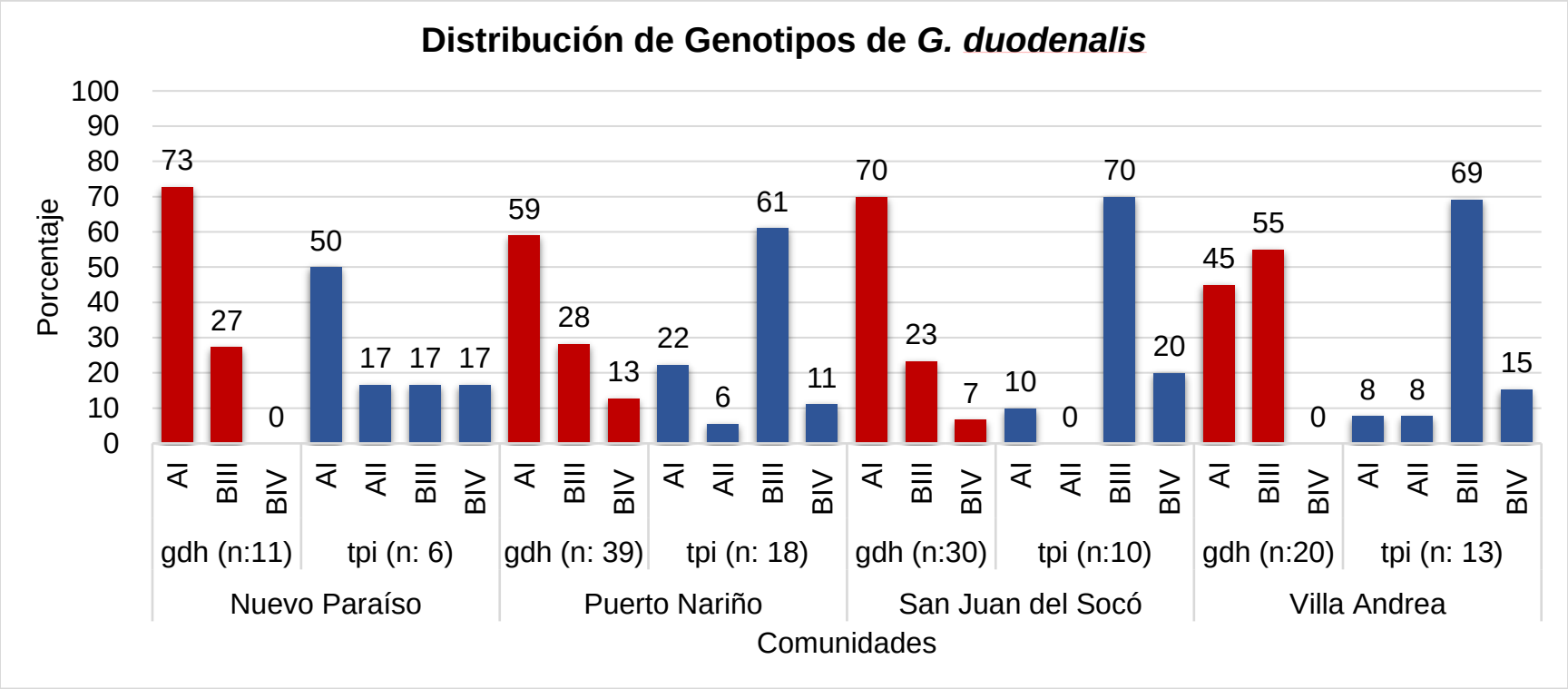

Figura 4 Frecuencia y distribución de ensamblajes de *Giardia* para cada una de las comunidades estudiadas.

En la siguiente gráfica, se encuentran los diferentes ensamblajes encontrados por comunidad con cada marcador, en Nuevo Paraíso *gdh* (n=11) *tpi* (n=6), Puerto Nariño *gdh* (n=39) *tpi* (n=18), San Juan del Socó *gdh* (n=30) *tpi* (n=10), Villa Andrea *gdh* (n=20) *tpi* (n= 13)

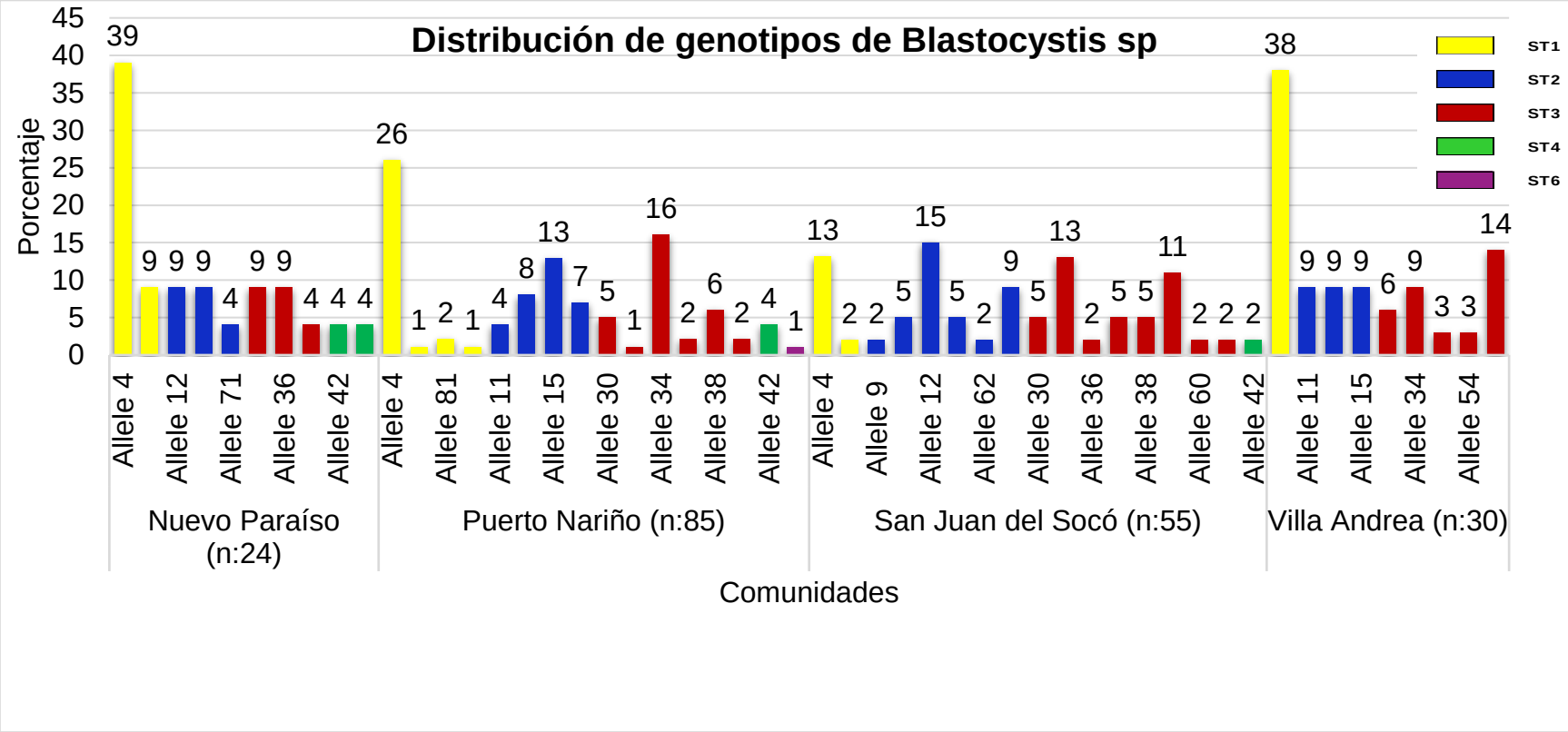

Figura 5 Frecuencia y distribución de STs y alelos de *Blastocystis* encontrados por cada comunidad del estudio

En la gráfica, se observan en colores los subtipos encontrados por cada comunidad, junto con el porcentaje de positividad para cada alelo por cada comunidad. En Nuevo Paraíso (n=24), Puerto Nariño (n=85), San Juan del Socó (n=55) y Villa Andrea (n=30)

Tabla 19 Frecuencia de infección, ensamblajes de *Giardia*, STs de *Blastocystis* sp

Test diagnóstico		N	*Giardia duodenalis*		*Blastocystis spp*		
			% (n)	IC 95 %	% (n)	IC 95 %	
Positivos por qPCR		284	64,8 (184)	[95%CI= 58,9 – 70,3]	88,7 (252)	[95%CI= 84,5 – 92,2]	
Genotipos			**Ensamblajes**		**Subtipos**		
	GDH (n =100)	**AI**	61 (61)	[50,7-70,6]	**ST1**	29,6 (59)	[23 - 36]
		BIII	32 (32)	[23,0-42,1]	**ST2**	30,5 (62)	[24 - 37]
		BIV	7 (7)	[2,9-13,9]	**ST3**	34,5 (70)	[28 - 41]
	TPI (n = 47)	**AI**	19,1 (9)	[9,1-33,3]	**ST4**	2,96 (6)	[1,0 - 6]
		AII	6,4 (3)	[1,3-17,5]	**ST6**	0,5 (1)	[0,01-2,2]
		BIII	59,6 (28)	[44,3-73,6]	**NC**	2,5 (5)	[0,8 – 5,6]
		BIV	14,9 (7)	[6,2-28,3]			

ND: No determinado
NA: No aplica
En la tabla se encuentra la frecuencia total de ensamblajes de *G. duodenalis* y STs *Blastocystis* sp junto con los intervalos de confianza para cada uno

Tabla 20 Asociación entre frecuencia de infección, edad, género y comunidad entre los individuos incluidos en el estudio.

			Género *			**Edad (años) ***					**Comunidad * %**				
			Femenino %	Masculino %	*p*	1-4 %	5-8 %	9-12 %	≥13 %	*p*	Nuevo Paraíso	Puerto Nariño	San Juan del Soco	Villa Andrea	*p*
***Giardia duodenalis* ensamblajes**	**GDH** (n =100)	AI	44,3	55,7	0,947	27,9	27,9	34,4	9,8	**0,033**	40	28	40,4	28,1	0,275
		BIII	43,8	56,3	0,972	56,2	18,7	15,6	9,4	0,071	15	13,4	13,5	34,4	**0,099**
		BIV	42,9	57,1	0,950	42,9	42,9	0,0	14,3	0,397	0,0	6,1	3,8	0,0	0,224
	TPI (n = 47)	AI	66,7	33,3	0,104	11,1	44,4	44,4	0,0	0,247	16,7	4,9	1,9	3,1	0,142
		AII	33,3	66,7	0,739	0,0	33,3	33,3	33,3	0,336	5,6	1,2	0,0	3,1	0,615
		BIII	32,1	67,9	0,080	39,3	28,6	25,0	7,1	0,626	5,6	13,4	13,5	28,1	0,135
		BIV	57,1	42,9	0,397	42,9	28,6	14,3	14,3	0,755	5,6	2,4	3,8	6,2	0,935
***Blastocystis* sp. STs**	(n=203) **	ST1	37,3	62,7	0,061	42,4	27,1	20,3	10,3	**0,029**	5,9	12,8	3,9	6,4	**0,012**
		ST2	58,1	41,9	0,046	25,8	29,0	30,7	14,5	0,892	2,5	13,3	10,3	4,4	0,373
		ST3	44,9	55,1	0,594	18,6	30,0	28,6	22,9	0,056	2,5	13,8	12,3	5,9	0,142
		ST4	50,0	50,0	0,902	16,7	50,0	33,3	0,0	0,533	0,99	1,5	0,5	0,0	0,333
		ST6	100	0,0	0,292	0,0	100	0,0	0,0	0,495	0,99	0,99	0,5	0,0	0,269

* Los porcentajes se calcularon por filas, considerando el número total de individuos en cada categoría

** ST no pudo ser identificado en 2,5% (n = 5) de las muestras secuenciadas

NC: no calculable. El estimador no pudo ser calculado porque uno de los campos no contenía datos durante el análisis de dispersión.

7.3.6 Índices de diversidad genética en *Giardia* y *Blastocystis*

Se calcularon los índices de diversidad genética por comunidad a través de los marcadores *gdh* y *tpi* para *Giardia* y 18S rRNA marcador para *Blastocystis* (Tabla 22). Las pruebas de significación entre los resultados de los índices de diversidad comunitaria (como muestras independientes), ayudaron a identificar la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de π por comunidad. En el caso de θ y Hd se encontraron perfiles de asociación diferencial entre los resultados obtenidos por los marcadores utilizados para cada especie. Los resultados del índice θ utilizando los resultados del marcador gdh (*G. duodenalis*), obtenidos para la comunidad de San Juan del Soco, mostraron una diferencia significativa con los resultados de Nuevo Paraíso y Villa Andrea.

Con la misma puntuación (*gdh*) se encontró una diferencia significativa entre los resultados de San Juan del Soco y Puerto Nariño. Los resultados del segundo marcador utilizado para la tipificación de G. intestinal (*tpi*), mostraron una diferencia significativa entre los resultados obtenidos entre San Juan del Soco, Puerto Nariño y Nuevo Paraíso. Se encontraron diferencias significativas con el Hd para *tpi* entre Nuevo Paraíso y las tres poblaciones restantes, pero también entre San Juan del Soco y Puerto Nariño. Además, Nuevo Paraíso mostró diferencias significativas con los resultados de las otras tres comunidades para θ y Hd, calculado para las secuencias obtenidas para 18S (*Blastocystis*) y se identificó diferencia significativa adicional para Hd calculada para San Juan del Soco y Puerto Nariño; a pesar de estos hallazgos, no se identificaron diferencias significativas entre las varianzas de las tasas entre estas poblaciones, por lo que la hipótesis de igualdad de los resultados de los índices de diversidad genética a nivel poblacional no es rechazada entre estas comunidades.

Tabla 21 Índices de diversidad genética de *tpi* y *gdh* para *G. duodenalis* y 18S rDNA para *Blastocystis* sp a través de las comunidades muestreadas en el estudio

	Giardia												***Blastocystis***					
	gdh						***tpi***						***18s***					
Community	***n***	**π**	**θ**	**SD- θ**	**Hd**	**SD-Hd**	***n***	**π**	**θ**	**SD- θ**	**Hd**	**SD-Hd**	***n***	**π**	**θ**	**SD- θ**	**Hd**	**SD-Hd**
Nuevo Paraíso	11	0,05082	0,04594	0,01907	0,945	0,054	6	0,18463	0,16612	0,07856	1,000	0,096	24	0,15537	0,20393	0,06647	0,996	0,013
Puerto Nariño	40	0,06885	0,10569	0,03142	0,894	0,044	18	0,10855	0,11842	0,04153	0,993	0,021	85	0,0878	0,13804	0,03499	0,972	0,008
San Juan del Soco	32	0,0740	0,12605	0,03904	0,839	0,065	10	0,05642	0,08532	0,03506	1,000	0,045	55	0,09551	0,15227	0,04177	0,988	0,006
Villa Andrea	20	0,06699	0,06034	0,02134	0,911	0,054	14	0,06025	0,10911	0,0408	0,989	0,031	34	0,09597	0,1152	0,03489	0,998	0,008
Total	103	0,06842	0,11628	0,02887	0,888	0,029	48	0,09736	0,12286	0,03471	0,998	0,005	198	0,08328	0,15432	0,0343	0,921	0,011

N = Número de secuencias
Hd = diversidad del haplotipo
SD = desviación estándar

7.3.7 Infecciones mixtas en *Giardia y Blastocystis*

Las infecciones mixtas entre *G. intestinalis y Blastocystis* sp fueron encontradas por microscopía en 19.6% (n = 29) siendo más común en Puerto Nariño con 27% (n = 20), seguido por Villa Andrea 16% (n = 4), Nuevo Paraíso 14.3 % (N = 2) y San Juan del Socó 8,6% (n = 3). En el momento del análisis frente a factores sociodemográficos, la comunidad, el sexo y la edad no fueron estadísticamente significativos. Además del análisis de una posible asociación entre subtipos de *Blastocystis* sp y ensamblajes de *G. duodenalis*, no mostró ninguna asociación. Las co-infecciones más frecuentes entre los ST de las asambleas *de Blastocystis* sp *y G. duodenalis* fueron evidentes; los ST 1, 2 y 3 presentan infección con el ensamblaje AI, el ST3 estaba presente en todos los ensamblajes, en el caso del ST4 con los ensamblajes AI, BIII y BIV. Finalmente, ST6 con un solo informe en Puerto Nariño presentó infección con el ensamblaje BIII. Se observó una mayor frecuencia de infecciones mixtas en la comunidad de Puerto Nariño y San Juan del Soco (Figura 5).

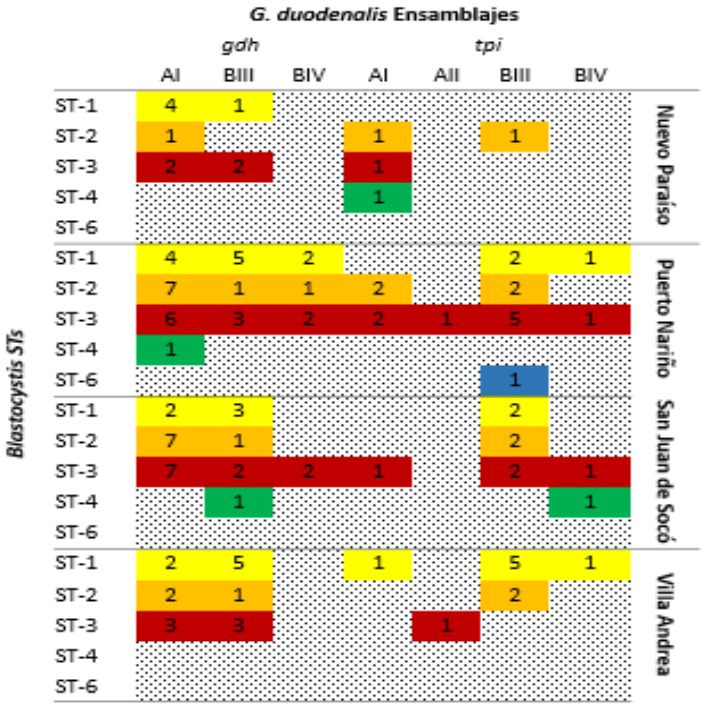

Figura 6 Infecciones mixtas entre subtipos de *Blastocystis* sp y ensamblajes de *G.duodenalis*

En la gráfica se encuentran muestras con infecciones mixtas entre los STs de *Blastocystis* (filas) junto con los ensamblajes de *G. duodenalis* (columnas) en toda la población y la frecuencia en número de muestras con infección mixta.

8. Discusión

El diagnóstico de parásitos intestinales se ha basado tradicionalmente en la microscopía en materia fecal y en el uso de técnicas convencionales basadas en la concentración para la posterior visualización de formas parasitarias. Esto conduce a obtener una variabilidad en el diagnóstico, siendo totalmente dependiente de la experiencia del observador [22]. El objetivo es entonces, mejorar y / o fortalecer el diagnóstico de las infecciones parasitarias, el uso de herramientas moleculares surge como alternativa para la identificación de diversos patógenos, es decir, hacer la identificación de especies y subpoblaciones parasitarias; y esto se traduce en una intervención específica y oportuna con una mejor gestión clínica de los pacientes, tienen la ventaja de permitir la detección de múltiples especies de parásitos utilizando una única muestra de heces y la capacidad para determinar la intensidad de la infección de cada especie [81].

Una de las estrategias en uso actualmente por diferentes grupos de investigación, es la epidemiología molecular. Esta epidemiología aplicada, demuestra ser de gran importancia ya que ayuda a comprender la dinámica de transmisión y los determinantes genéticos de las enfermedades infecciosas parasitarias [110]. Por ejemplo, informes recientes demuestran que la giardiasis en la niñez está asociada con factores de desnutrición, retraso del crecimiento y deterioro del desarrollo cognitivo, independientemente de la presencia de diarrea. Los reportes de prevalencia confirman su mayor frecuencia en población infantil que se encuentra entre los dos a cinco años, según varios informes de países en desarrollo [69]. Lo anterior está estrechamente relacionado con los

determinantes ambientales y las características socioeconómicas de una población, que generan un mayor riesgo de infección. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su plan de acción plantea la detección, tratamiento y control de los parásitos intestinales, ya que esta es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños de todo el mundo [6, 32].

Indicadores implicados o relacionados estrechamente con la salud de la población, son importantes para comparar la importancia relativa de las enfermedades, realizar un seguimiento de las diferencias en las tendencias de los distintos países y tendencias en el tiempo, permiten proporcionar un marco para evaluar el costo-efectividad de las intervenciones realizadas en las poblaciones a riesgo [111]. La estimación de la carga de diferentes enfermedades requiere de información o datos fiables de la prevalencia de cada enfermedad y un marco analítico dentro del cual estimar la morbilidad y la mortalidad atribuible como por ejemplo a las infecciones por parásitos intestinales [112].

Una respuesta inmune, que es individualmente variable e influenciada por el estado nutricional, factores genéticos, y la exposición a diferentes agentes infecciosos, contribuyen a la persistencia de infecciones que cursan con variedad de síntomas [113], adicionalmente la presentación clínica de estas infecciones hace difícil diferenciarlas de otras causas bacterianas y virales de la diarrea, es así que el diagnóstico mediante pruebas de detección de ADN como la PCR, son la alternativa para la identificación de los diferentes agentes causales [19].

Los resultados de este trabajo reafirman el uso y aplicabilidad de las estrategias moleculares, los datos reportados, donde se observaron altas tasas de infección por *Giardia* (23,8% por microscopía y 65,9% por qPCR) y *Blastocystis* (35,3% por microscopía y 89,7% por qPCR), para el complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* se logró hacer identificación de la especie patógena con un 7,3%, el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) reportó las cifras que muestran un pico en la prevalencia de *G. duodenalis* a la edad de 1-4 años durante 2011-2012 [114], lo cual concuerda con nuestros resultados para *Giardia* la frecuencia fue mayor en niños de 1-7 años (56,1%).

Los estudios relacionados con la edad en *E. histolytica* se ven obstaculizados por la necesidad de diferenciarlo de *E. dispar* y *E. moshkovskii* utilizando otros métodos como la qPCR o PCR convencional. Al realizar la identificación de las especies pertenecientes al Complejo *E/histolytica/E.dispar/E.moshkovskii* describen que la población de edad temprana, demuestra una prevalencia combinada de *E. histolytica y E. dispar/ E.moshkovskii*, donde es significativamente mayor en los grupo de edad de 5-14 años, en comparación con los grupos más jóvenes entre los 1-4 años o los mayores de 45 años, congruente con los hallazgos de microscopía en este trabajo reportando mayor frecuencia en niños de 8-19 años (64,8%) por microscopía [14].

Las frecuencias de infección por *Giardia y Blastocystis* están relacionadas con otros reportes en Colombia, comparable con las frecuencias del país para *Giardia* 15,4% y *Blastocystis* 57,7% [6]. Por otra parte se apoya el uso de métodos moleculares en lugar de la microscopía convencional, como han sido claramente establecidos por diferentes autores que buscan fortalecer el diagnóstico convencional [22, 63, 115-117].

A pesar de no haber encontrado ningún tipo de asociación entre las factores sociodemográficos del grupo de estudio, las frecuencias de infección entre género, mostró una distribución casi uniforme entre mujeres y hombres; la distribución por grupos de edad frente a las frecuencias de parásitos en las diferentes comunidades presenta un comportamiento particular; en niños menores a siete años es más común encontrar infecciones por *Giardia* y con mayor frecuencia en mujeres; en cuanto a los grupos de edad, por *Trichuris*, es más frecuente en niños mayores de ocho años. Podemos encontrar frecuencias elevadas de infecciones tanto por Complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* y por *Ancylostoma*; en otros estudios las personas menores de 18 años de edad tenían más probabilidades de estar infectados con *A. lumbricoides, T. trichiura* y *G. intestinalis*, pero no con los otros parásitos de importancia clínica, pero contradictoriamente, generalmente se reconoce que antes de la pubertad (por debajo de los 15 años de edad), la prevalencia, pero sobre todo la intensidad de la infección, sufre picos de infección frente a *A. lumbricoides y T. trichiura*. [118], probablemente reflejando la resistencia relacionada con la edad.

Con las infecciones por protozoos, a ausencia de edad relacionada con la prevalencia de protozoos comensales es compatible con su probable papel como parte de la microbiota intestinal para algunos de los protozoarios reportados, posiblemente no es afectada por factores limitantes como la edad y el desarrollo de resistencia inmunitaria. De otra manera se podría explicar la presencia sub estimada de *Blastocystis sp* en las poblaciones objeto de estudio, este protozoo presenta una distribución homogénea en casi toda la población y para este estudio en particular, apoyando la hipótesis de algunos autores, que puede de ser propio de la microbiota intestinal, además que este parásito sigue siendo considerado no patógeno [14]

Adicionalmente, el comportamiento de las parasitosis no siempre refleja una distribución geográfica específica, sobre todo con lo que tiene que ver con parásitos intestinales; por ejemplo, para los ensamblajes de *G. intestinalis* hay una falta de estructuración geográfica en todo el mundo (en el caso de las asociaciones humano-infecciosas y los ensamblajes A y B). En el centro y sur de América, existen áreas con distribución diferencial de ensamblajes. Algunos informes de México, Brasil y Colombia identifican frecuencias más altas para el ensamblaje A 56,6% y el ensamblaje B 74,1% [119, 120], mientras que en Nicaragua, Argentina e incluido Colombia, algunos autores reportan el predominio del ensamblaje B 90% [42, 121-123]. Esto sugiere que la distribución no está geográficamente asociada y está más vinculada a los factores socioeco-epidemiológicos propios de una población. Esto es corroborado por los hallazgos donde el ensamblaje más frecuente fue AI (61%), contrastando los diferentes hallazgos en tres regiones simpátricas del país. Por ejemplo, en el Caribe y en la región central, el ensamblaje más frecuente fue el B [42, 123], pero en la región andina el ensamblaje A suele ser el más frecuente [124]. El ensamblaje AI, se ha asociado más a infecciones en animales que en los seres humanos; esto podría atribuirse a la falta de tratamiento de agua de la población estudiada y a un contacto cercano con animales de vida silvestre, como es frecuente en la región amazónica. La presencia del ensamblaje AI, también podría ser posible debido a la contaminación del agua de consumo con aguas residuales crudas de origen animal y humano [125]. Siendo evidente que las poblaciones indígenas carecen del acceso al agua potable.

Los resultados, también mostraron la alta frecuencia del ensamblaje BIII, segundo más frecuente. Este ensamblaje, está altamente asociado a infecciones en perros y gatos que podrían estar sugiriendo una fuerte transmisión zoonótica en la comunidad de Villa Andrea con 35,5% de positividad en niños menores de cinco años [121]. Respecto a los índices de diversidad genética se observa que San Juan del Socó es la comunidad con mayor diversidad genética y la segunda comunidad con mayores índices de infección por *Giardia* (65%), siendo el ensamblaje AI el más frecuente (40,4%), esta comunidad es la más lejana del municipio de Puerto Nariño, lo que sugiere que la transmisión enzoótica activa podría estar ocurriendo, representando un punto importante de diversidad donde distintos genotipos de animales podrían transmitirse a los seres humanos.

La existencia de muchos subtipos dentro de las familias de *C. hominis* y *C. parvum* apoya la complejidad de la transmisión de *Cryptosporidium spp* y su potencial zoonótico en los países en desarrollo [126]. Los subgenotipos considerados antropóticos (IIc y IIe) son los más comunes, junto con el subgénero zoonótico IId y el subgénero IIc presente en las infecciones humanas [127, 128]. Estos datos apoyan los hallazgos sobre los subtipos encontrados IdA19 e IaA12R8 en *C. hominis* y IIcA5G3c en C*. parvum*. Adicionalmente, se presenta el primer informe de *C. viatorum* en Colombia; los datos recogidos en diferentes estudios indican la presencia de *C. viatorum* en Asia (Nepal, Bangladesh, India, Pakistán y potencialmente Dubai), África (Nigeria, Etiopía y Kenya) y Centroamérica y el Caribe (Guatemala y Barbados) [129]. *C. viatorum* es actualmente la única especie de *Cryptosporidium* que ha sido reportada solo en seres humanos pero los datos son todavía insuficientes para asegurar que esta especie se restrinja a infecciones humanas; también se presume que sea de distribución global [130]. Paralelamente otros estudios indican que la especie de *C. viatorum* tiene una variación genética que puede estar relacionada con diferencias en el origen geográfico de la infección [130].

Se observó una alta frecuencia de *Blastocystis* sp en el estudio por qPCR (89,7%), lo que concuerda con reportes previos de infección por *Blastocystis* sp en Colombia [63, 131]. Además, esta frecuencia es muy similar a la de otros países de América del Sur que van del 40% al 70% en humanos [62, 65]. Con respecto a la distribución de STs en humanos, un estudio en América del Sur mostró una gran diversidad encontrando STs 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8 y 12. En el caso de Colombia se han reportado en seres humanos los STs 1, 2, 3, 4, 6 y 7 [65, 132]. Los resultados muestran el predominio de STs 1, 2 y 3 que es consistente con previos reportes, incluso en comunidades indígenas como lo ocurrido en Mato Grosso, Brasil [132]. Aquí se presentan varios hallazgos importantes que son la descripción del ST4 en comunidades indígenas, ya que este ST es más común en Europa y menos frecuente en América del Sur. Además, el hallazgo de ST6 que es más común en aves y puede ser una evidencia de transmisión zoonótica a través de la población [133]. Cuando se obtuvieron los resultados de los alelos, se observó que el alelo 4 de ST1 era frecuente en las cuatro comunidades; la presencia de este alelo ya se ha descrito en Colombia con una frecuencia de 9% en toda América del Sur. Además, este alelo ha sido reportado en *Didelphis marsupialis* de Colombia, apoyando de nuevo una transmisión zoonótica plausible [63, 65]. En el caso de la ST2, se observaron los alelos 12 y 15 en todas las comunidades, como ya se ha descrito en América del Sur con frecuencias del 14% y 4% respectivamente, pero de nuevo San Juan del Socó mostró un mayor número de alelos ST2 (6 en total) de acuerdo con los índices de diversidad genética ya descritos. Además, el alelo 9 se encontró en esta comunidad y fue descrito previamente en perros y ratas, lo que sugiere de nuevo un posible perfil zoonótico [44, 134]. Con respecto al ST3, el alelo más frecuente fue el 34 reportado anteriormente en Colombia con una frecuencia de 12% en América del Sur [56]. Este alelo se ha asociado a la urticaria en pacientes argentinos y también a bovinos en Colombia [58, 63]. Para el ST4, encontramos los alelos 42 y 90, el alelo 42 se ha descrito en todo el mundo pero el alelo 90 no había sido descrito hasta el momento en el país; y se ha encontrado en perros y gatos infectados con alelos 42 y 133 [135]. Por último, para el ST6 identificamos el alelo 134 en Puerto Nariño, que es una descripción novedosa para el país, ya que sólo hay un informe del alelo 122 [65]

De acuerdo con los resultados obtenidos con infecciones mixtas entre *Blastocystis* y *G. intestinalis* (Figura 5), pone nuevamente en evidencia la necesidad de emplear técnicas basadas en el uso de diferentes marcadores moleculares para realizar una identificación real de diferentes subpoblaciones presentes en un área específica, y lograr asociaciones en cuanto a factores de riesgo [38]. Además, en el caso de infecciones mixtas, se destaca la frecuencia de infección con el ST5, y su presencia en América Latina sólo se había

descrito en Bolivia 20% (n = 8) [65], anteriormente se había reportado en el Reino Unido, Australia y Pakistán [136, 137]. La importancia de este ST es el potencial zoonótico, puesto que el reporte previo fue en infecciones de cerdos y ganado [138], reafirmando la importancia en relación directa con las actividades humanas y posibles infecciones que pueden ocurrir entre diferentes escenarios epidemiológicos.

Un dato adicional e interesante, que se observa en el momento de hacer la comparación de los datos obtenidos con las dos técnicas, es la discrepancia entre lo reportado en microscopía con *Trichuris trichiura* 61,7% (n=161) frente a 48,7% (n=127) (Tabla 18), obtenido por qPCR, es una diferencia marcada a pesar de conocer la sensibilidad y especificidad que brinda esta técnica molecular, entonces una vez revisado el protocolo de extracción, encontrando que la fase de lisis no lograba romper los huevos de los helmintos en menor proporción los de *Ascaris* y *Trichuris* (Figura 2); siendo el proceso de extracción de ADN quien garantiza en gran medida el éxito de cualquier técnica molecular, en diferentes trabajos se han desarrollado estrategias para estandarizar este proceso, para los huevos de nematodos [139] Por lo tanto, la eficacia diagnóstica de la PCR y su especificidad permitirá disminuir los falsos negativos en la medida que se logre optimizar la extracción, resultando en el aumento de la detección de los geohelmintos, [140], los cuales son los que presentan gran problema por su estructura en las capas o la corteza de los huevos para el caso de *Trichuris* y *Ascaris* específicamente, son más difíciles de romper, esto en gran medida generó las diferencias en las frecuencias de infección encontradas en este trabajo; y por ende también en las intensidades de infección o carga parasitaria reportadas [101].

La proyección de la verdadera prevalencia, sensibilidad y especificidad para cualquier método molecular implementado para la identificación de ADN parasitario, al comparan los métodos moleculares (principalmente qPCR) para diagnosticar geohelmintos, a pesar de que se han encontrado un aumento de positividad en algunos, la mayoría de autores manifiestan la dificultad de obtener resultados confiables debido a la extracción y difícil obtención de ADN para estos helmintos [141]. Estudios previos han utilizado larvas o adultos y / o muestras de huevos, estableciendo diferentes estrategias en los protocolos

para la extracción de ADN, debido a las dificultades ya descritas con el fin de mejorar la sensibilidad de la PCR para identificar ADN parasitario [73, 142]

De acuerdo a los hallazgos, la alta frecuencia de parásitos intestinales es evidente en los grupos étnicos, reafirmando que se requieren mejoras en los programas de infraestructura y educación sanitaria para reducir el riesgo de infección por parásitos intestinales. La mayoría de los pueblos indígenas en todo el mundo viven con mala salud, en condiciones que están asociados con la malnutrición, hacinamiento, mala higiene y contaminación ambiental [99].

La cuenca del Amazonas es la más grande del mundo y es la quinta reserva de agua dulce del planeta. Contradictoriamente, las personas que viven en estas áreas tienen mala calidad de vida, lo que favorece la infección de enfermedades de transmisión fecal-oral. Por lo tanto, el control adecuado de las infecciones parasitarias, particularmente en la región amazónica, requieren mejorar la calidad del agua potable y reducir la contaminación ambiental por las heces y el riesgo generado por el contacto cercano con la vida silvestre; a pesar de ser infecciones de impacto en la salud en todo el mundo. En diferentes estudios se reportan evidencias que las personas que viven cerca de un cuerpo de agua como un río, corren mayor riesgo de infectarse con algún parásito intestinal. En un estudio reciente de la amazonía brasileña [143], pone de relieve la importancia de estos hallazgos y demuestra la necesidad de implementar estrategias de control y prevención en las comunidades estudiadas siendo consideradas comunidades indígenas vulnerables.

9. Conclusiones y recomendaciones

9.1 Conclusiones

Se observó una diferencia entre las frecuencias positivas frente al total de muestras analizadas entre las dos técnicas, esto reflejado por la alta sensibilidad que presenta la qPCR con un aumento en las tasas de detección. El uso de técnicas basadas en el análisis de ADN parasitario permite obtener datos más precisos frente a muestras negativas presentes en zonas con baja prevalencia, además de brindar información útil para conocer el estado epidemiológico de estos parásitos en una población y su potencial zoonótico.

Los datos obtenidos sobre las infecciones parasitarias en los países en desarrollo son cruciales para evaluar el estado de las enfermedades desatendidas, impulsar el uso de nuevas tecnologías basadas en la biología molecular que permitan mejorar el diagnóstico como detectar varios parásitos de importancia clínica en una muestra, brinda la oportunidad de proponer mejoras en las medidas de control y tratamientos en las diferentes comunidades.

Aproximadamente el 90% de la población de la Amazonía está compuesta por indígenas y su asistencia sanitaria sigue siendo un reto. Se requieren mejoras en los programas de

infraestructura y educación sanitaria para Reducir el riesgo de infección por parásitos intestinales [144].

Se emplearon métodos moleculares de alta resolución de genotipificación para comprender la dinámica de transmisión de los parásitos más frecuentes, a través de cuatro comunidades indígenas de la cuenca amazónica colombiana. Se observó un alto perfil de transmisión zoonótica en relación con los ensablajes de *Giardia y STs* y/alelos *Blastocystis*. San Juan del Socó fue la comunidad con mayor diversidad genética tanto para los patógenos como para el más cercano al espacio de la selva, todo lo anterior sugiere una transmisión activa en estas áreas del país

También destacamos la elevada frecuencia de infección por estos dos protozoos, de la frecuencia de geohelmintos en estas poblaciones como lo es *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, debido al gran impacto que tienen en la salud y las consecuencias de su infección en las poblaciones a riesgo como lo es la población infantil.

Los hallazgos refuerzan la necesidad de implementar mejores sistemas de vigilancia epidemiológica para patógenos entéricos en la zona y el uso de la epidemiología molecular para una amplia comprensión de la dinámica de transmisión, incluyendo el potencial zoonótico de estas especies, demostrado que el diagnóstico de parásitos intestinales basados en estas técnicas optimizando y garantizando los determinantes de calidad en el procesamiento de las muestras, generan información valiosa sobre las tasas de prevalencia para la mayoría de los parásitos en estas poblaciones en riesgo.

9.2 Recomendaciones

Se sugiere seguir trabajando en la estandarización del protocolo de extracción, el cual permita de manera práctica optimizar el procedimiento y que sea fácil de realizar, con lo observado en el proceso, se debe hacer énfasis en la fase de lisis puesto que la ruptura de los huevos de helmintos son el problema para optimizar los protocolos.

Continuar con la estandarización de la qPCR tanto para helmintos como protozoos, una vez solucionado el inconveniente de la extracción, buscar nuevas estrategias que permitan mejorar u optimizar los controles usados como positivos para los geohelmintos, debido a que estos no son los ideales para realizar una curva estándar, debido a que es una muestra de materia fecal y no son provenientes de cultivo o cepa de referencia como se sugiere para realizar este tipo de estandarizaciones; es importante continuar con la evaluación de las capacidades operativas de la técnica para usarla como ayuda diagnóstica.

Los resultados de este trabajo pueden ser complementados a través de nuevos estudios que evalúen las condiciones de procesamiento de las muestras, incluyendo el protocolo de extracción, estandarización a punto de la qPCR a partir de curvas estándar para optimizar la eficiencia de la misma, pero teniendo en cuenta que se debe realizar por separado para cada parásito, debido a que desde su estructura son muy diferentes.

Bibliografía

1. Lustigman, S., et al., *A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1582.
2. Hürlimann, E., et al., *The epidemiology of polyparasitism and implications for morbidity in two rural communities of Côte d'Ivoire.* Parasites & vectors, 2014. **7**(1): p. 81.
3. Fletcher, S.M., et al., *Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective.* Clinical microbiology reviews, 2012. **25**(3): p. 420-449.
4. Ghenghesh, K.S., et al., *Prevalence of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium spp. in Libya: 20002015.* Libyan Journal of Medicine, 2016. **11**(1).
5. Espinosa Morales, M., M. Alazales Javiqué, and A.M. García Socarrás, *Parasitosis intestinal, su relación con factores ambientales en niños del sector" Altos de Milagro", Maracaibo.* Revista cubana de medicina general integral, 2011. **27**(3): p. 396-405.
6. Ministerio de Salud y Protección Social, U.d.A., *Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en Población Escolar, Colombia 2012-2014*, U.d.A. Facultad Nacional Salud Pública, El Ministerio, Editor. 2015.
7. Sturrock, H.J., et al., *Integrated mapping of neglected tropical diseases: epidemiological findings and control implications for northern Bahr-el-Ghazal State, Southern Sudan.* PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(10): p. e537.
8. López, M.C., et al., *Atlas de Parasitología*, E.M.M.S.A.d. C.V, Editor. 2012.
9. Ortiz, C., M.C. López, and F.A. Rivas, *Helminth prevalence in a waste-water plant at El Rosal, Cundinamarca.* Revista de Salud Pública, 2012. **14**(2): p. 296-304.
10. Knopp, S., et al., *Diagnostic accuracy of Kato–Katz, Flotac, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and Strongyloides stercoralis infections in Tanzania.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2014. **90**(3): p. 535-545.

11. Organization, W.H., *Research priorities for helminth infections: technical report of the TDR disease reference group on helminth infections*. 2012: World Health Organization.
12. Martins, M., et al., *Progression of the load of waterborne and intestinal parasitic diseases in the State of Amazonas.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015. **48**: p. 42-54.
13. Carlos Jr, E., *Health and indigenous peoples in Brazil: reflections based on the First National Survey of Indigenous People's Health and Nutrition.* Cadernos de Saúde Pública, 2014. **30**(4): p. 855-859.
14. Incani, R.N., et al., *Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR.* Acta Tropica, 2017. **167**: p. 64-70.
15. Hashmey, R., R.M. Genta, and A.C. White, *Parasites and diarrhea. I: Protozoans and diarrhea.* Journal of travel medicine, 1997. **4**(1): p. 17-31.
16. Van Gool, T., et al., *Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice.* European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2003. **22**(5): p. 284-290.
17. Vandenberg, O., et al., *Improvement of routine diagnosis of intestinal parasites with multiple sampling and SAF-fixative in the triple-faeces-test.* Acta gastro-enterologica Belgica, 2005. **69**(4): p. 361-366.
18. Lammie, P.J., A. Fenwick, and J. Utzinger, *A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes.* Trends in parasitology, 2006. **22**(7): p. 313-321.
19. Haque, R., et al., *Multiplex real-time PCR assay for detection of Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis, and Cryptosporidium spp.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2007. **76**(4): p. 713-717.
20. DuPont, H.L., *Persistent diarrhea: a clinical review.* Jama, 2016. **315**(24): p. 2712-2723.
21. Schneider, M.C., et al., *Elimination of neglected diseases in Latin America and the Caribbean: a mapping of selected diseases.* PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(2): p. e964.
22. Mejia, R., et al., *A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations.* Am J Trop Med Hyg, 2013. **88**(6): p. 1041-7.
23. Cimino, R.O., et al., *Identification of human intestinal parasites affecting an asymptomatic peri-urban Argentinian population using multi-parallel quantitative real-time polymerase chain reaction.* Parasites & vectors, 2015. **8**(1): p. 380.
24. Verweij, J.J. and C.R. Stensvold, *Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections.* Clinical microbiology reviews, 2014. **27**(2): p. 371-418.
25. Stanley, S.L., *Amoebiasis.* The Lancet, 2003. **361**(9362): p. 1025-1034.

26. Heredia, R.D., J.A. Fonseca, and M.C. López, *Entamoeba moshkovskii perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis.* Acta tropica, 2012. **123**(3): p. 139-145.
27. Reed, S.L., *New concepts regarding the pathogenesis of amebiasis.* Clinical infectious diseases, 1995. **21**(Supplement 2): p. S182-S185.
28. Sargeaunt, P., *The reliability of Entamoeba histolytica zymodemes in clinical diagnosis.* Parasitology today, 1987. **3**(2): p. 40-43.
29. Botero, D. and M. Restrepo, *Parasitosis Humanas*, CIB, Editor. 2012. p. 510.
30. López, M.C., et al., *Molecular epidemiology of Entamoeba: First description of Entamoeba moshkovskii in a rural area from Central Colombia.* PloS one, 2015. **10**(10): p. e0140302.
31. Guzmán, C.E., et al., *Diferenciación de Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar en muestras de materia fecal por detección de adhesina de E. histolytica mediante ELISA.* Biomédica, 2001. **21**(2): p. 167-71.
32. Haque, R., et al., *Giardia assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh.* J Infect Dis, 2005. **192**(12): p. 2171-3.
33. López, O.Y., et al., *Diferenciación del complejo Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar mediante Gal/GalNAc-lectina y PCR en aislamientos colombianos.* Revista médica de Chile, 2012. **140**(4): p. 476-483.
34. Monis, P.T., S.M. Caccio, and R.A. Thompson, *Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus.* Trends in parasitology, 2009. **25**(2): p. 93-100.
35. Rodriguez-Morales, A.J., et al., *Estimating and mapping the incidence of giardiasis in Colombia, 2009-2013.* Int J Infect Dis, 2016. **49**: p. 204-9.
36. Kohli, A., et al., *Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2008. **102**(7): p. 718-725.
37. Ravid, Z., et al., *Genetic diversity of Giardia intestinalis populations in Colombia.* Biomédica, 2007. **27**(1): p. 34-41.
38. Ryan, U. and S.M. Caccio, *Zoonotic potential of Giardia.* Int J Parasitol, 2013. **43**(12-13): p. 943-56.
39. Mayrhofer, G., et al., *Division of Giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with Giardia muris.* Parasitology, 1995. **111 (Pt 1)**: p. 11-7.
40. Thompson, R.C., *Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential.* Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1259-67.
41. Monis, P.T., S.M. Caccio, and R.C. Thompson, *Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus.* Trends Parasitol, 2009. **25**(2): p. 93-100.

42. Ramirez, J.D., et al., *Molecular diagnosis and genotype analysis of Giardia duodenalis in asymptomatic children from a rural area in central Colombia.* Infect Genet Evol, 2015. **32**: p. 208-13.
43. Roberts, T., et al., *Update on the pathogenic potential and treatment options for Blastocystis sp.* Gut Pathog, 2014. **6**: p. 17.
44. Stensvold, C., *Blastocystis: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology.* Tropical Parasitology, 2013. **3**(1): p. 26-34.
45. Kotloff, K.L., et al., *Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study.* The Lancet, 2013. **382**(9888): p. 209-222.
46. Chalmers, R.M. and A.P. Davies, *Minireview: clinical cryptosporidiosis.* Experimental parasitology, 2010. **124**(1): p. 138-146.
47. Xiao, L., *Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update.* Exp Parasitol, 2010. **124**(1): p. 80-9.
48. Anusz, K., et al., *Detection of Cryptosporidium parvum oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay.* Journal of clinical microbiology, 1990. **28**(12): p. 2770-2774.
49. Clarke, S. and M. McIntyre, *Modified detergent Ziehl-Neelsen technique for the staining of Cyclospora cayetanensis.* Journal of clinical pathology, 1996. **49**(6): p. 511-512.
50. Garcia, L.S., et al., *Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens.* Journal of clinical microbiology, 1983. **18**(1): p. 185-190.
51. Martinez, I., B. Neto, and F. Miguel, *Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis.* Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2001. **43**(2): p. 79-82.
52. Díaz-Lee, A., et al., *Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de Cryptosporidium spp. aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar.* Archivos de medicina veterinaria, 2015. **47**(1): p. 91-96.
53. Xiao, L. and U.M. Ryan, *Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology.* Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(5): p. 483-90.
54. Sulaiman, I.M., et al., *Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait.* Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(6): p. 2805-2809.
55. Stensvold, C.R., *Blastocystis: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology.* Trop Parasitol, 2013. **3**(1): p. 26-34.
56. Ramírez, J.D., et al., *Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia.* Infection, Genetics and Evolution, 2014. **22**: p. 223-228.
57. Scanlan, P.D., et al., *The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota.* FEMS Microbiol Ecol, 2014. **90**(1): p. 326-30.

58. Casero, R.D., et al., *Blastocystis and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation.* Acta Trop, 2015. **148**: p. 156-61.
59. Audebert, C., et al., *Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota.* Scientific reports, 2016. **6**.
60. Andersen, L.O.B., et al., *A retrospective metagenomics approach to studying Blastocystis.* FEMS microbiology ecology, 2015. **91**(7): p. fiv072.
61. Andersen, L.O.B. and C.R. Stensvold, *Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective?* Journal of clinical microbiology, 2016. **54**(3): p. 524-528.
62. Jimenez-Gonzalez, D.E., et al., *Blastocystis infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population.* Parasitology research, 2012. **110**(3): p. 1269-1275.
63. Ramirez, J.D., et al., *Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia.* Infect Genet Evol, 2014. **22**: p. 223-8.
64. Stensvold, C.R., M. Alfellani, and C.G. Clark, *Levels of genetic diversity vary dramatically between Blastocystis subtypes.* Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 263-73.
65. Ramírez, J.D., et al., *Geographic distribution of human Blastocystis subtypes in South America.* Infection, Genetics and Evolution, 2016. **41**: p. 32-35.
66. AbuOdeh, R., et al., *Prevalence and subtype distribution of Blastocystis in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates.* Infection, Genetics and Evolution, 2016. **37**: p. 158-162.
67. Stensvold, C.R., *Laboratory diagnosis of Blastocystis spp.* Tropical parasitology, 2015. **5**(1): p. 3.
68. Bethony, J., et al., *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm.* The Lancet, 2006. **367**(9521): p. 1521-1532.
69. Montresor, A., *Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes*. 2002: World Health Organization.
70. Chitkara, R.K. and G. Krishna. *Parasitic pulmonary eosinophilia*. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2006. Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
71. Leles, D., et al., *Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new Ascaris sp. genotype in Brazil.* Veterinary parasitology, 2009. **163**(1): p. 167-170.
72. Das, K., P. Chowdhury, and S. Ganguly, *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) based sequence typing reveals phylogenetically distinct Ascaris population.* Computational and structural biotechnology journal, 2015. **13**: p. 478-483.

73. Criscione, C.D., et al., *Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs.* Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2007. **274**(1626): p. 2669-2677.
74. Basuni, M., et al., *A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2011. **84**(2): p. 338-343.
75. Liu, G.-H., et al., *Clear genetic distinctiveness between human-and pig-derived Trichuris based on analyses of mitochondrial datasets.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(2): p. e1539.
76. Cutillas, C., et al., *Trichuris suis and Trichuris trichiura are different nematode species.* Acta tropica, 2009. **111**(3): p. 299-307.
77. Eijck, I. and F. Borgsteede, *A survey of gastrointestinal pig parasites on free-range, organic and conventional pig farms in the Netherlands.* Veterinary research communications, 2005. **29**(5): p. 407-414.
78. Gruijter, J.M., et al., *Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of Ancylostoma duodenale and Necator americanus infections in humans in northern Ghana.* Tropical Medicine & International Health, 2005. **10**(6): p. 574-580.
79. Stoltzfus, R.J., et al., *Epidemiology of iron deficiency anemia in Zanzibari schoolchildren: the importance of hookworms.* The American journal of clinical nutrition, 1997. **65**(1): p. 153-159.
80. Periago, M.V. and J.M. Bethony, *Hookworm virulence factors: making the most of the host.* Microbes and infection, 2012. **14**(15): p. 1451-1464.
81. Verweij, J.J., et al., *Simultaneous detection and quantification of Ancylostoma duodenale, Necator americanus, and Oesophagostomum bifurcum in fecal samples using multiplex real-time PCR.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2007. **77**(4): p. 685-690.
82. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 1988. **239**(4839): p. 487.
83. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA.* Nucleic acids research, 2000. **28**(12): p. e63-e63.
84. Liang, S.-Y., et al., *Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Entamoeba histolytica.* Journal of clinical microbiology, 2009. **47**(6): p. 1892-1895.
85. Ramirez, J.C., et al., *Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients.* J Mol Diagn, 2015. **17**(5): p. 605-15.
86. Duffy, T., et al., *Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients.* PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(4): p. e419.
87. Poma, H.R., et al., *Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR: Efecto*

de las sustancias inhibidoras. Revista argentina de microbiología, 2012. **44**(3): p. 144-149.

88. Espy, M., et al., *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.* Clinical microbiology reviews, 2006. **19**(1): p. 165-256.
89. Klein, D., *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations.* Trends in molecular medicine, 2002. **8**(6): p. 257-260.
90. Hernández, C., et al., *Molecular diagnosis of Chagas disease in Colombia: Parasitic loads and Discrete Typing Units in patients from acute and chronic phases.* PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(9): p. e0004997.
91. Zárate Botía, C.G., *Hacia un CONPES INDÍGENA amazónico: Construyendo una política pública integral para los pueblos indígenas de la Amazonia colombiana. Volumen II*. 2012, Universidad Nacional de Colombia. Sede Amazonia. Instituto Amazónico de Investigaciones Imani.
92. Rodríguez-Celis, C.A., *Plan de Desarrollo del Departamento del Amazonas 2012–2015.* Departamento del Amazonas, 2012. **17**.
93. Tobón, M.A., *La fórmula biodiversidad–cultura y el poder político en el extremo sur del Trapecio Amazónico colombiano.* universitas humanística, 2006. **62**(62).
94. Bara Neto, P., R. Sánchez, and G. Wilmsmeier, *Hacia un desarrollo sustentable e integrado de la Amazonía: los corredores de transporte en la cuenca amazónica central-occidental y sus afluentes principales en Brasil, Colombia, Ecuador y Perú*. 2006: CEPAL.
95. Corrales Fuentes, L., et al., *Parasitismo intestinal infantil: factores epidemiológicos en Orange Walk, Belice.* Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río, 2011. **15**(4): p. 163-178.
96. López, M.C., D.A. Quiroz, and A.E. Pinilla, *Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal.* Acta médica colombiana, 2008. **33**(2): p. 75-83.
97. Brooker, S., et al., *Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya.* East African medical journal, 2000. **77**(3).
98. Ordoñez, L.E.O. and E.S.A. Martíez, *Parasitismo intestinal en Valle del Guamuez y San Miguel, Putumayo, Colombia.* Med. lab, 2000. **9**(11/12): p. 565-575.
99. Oliveira, R.A., R. Gurgel-Goncalves, and E.R. Machado, *Intestinal parasites in two indigenous ethnic groups in northwestern Amazonia.* Acta Amazonica, 2016. **46**(3): p. 241-246.
100. Fonte Galindo, L., et al., *Eficacia antiamebiana del metronidazol demostrada en un estudio realizado en la provincia de Cienfuegos.* Revista Cubana de Medicina Tropical, 2002. **54**(2): p. 101-105.
101. Da Silva, A.J., et al., *Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens.* Molecular Diagnosis, 1999. **4**(1): p. 57-64.

102. Fahle, G.A. and S.H. Fischer, *Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens.* Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(10): p. 3860-3863.
103. Stensvold, C.R., et al., *Development and Evaluation of a Genus-Specific, Probe-Based, Internal-Process-Controlled Real-Time PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of Blastocystis spp.* Clinical Microbiology, 2012. **50**: p. 1847–1851.
104. Hamzah, Z., et al., *Differential detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, and Entamoeba moshkovskii by a single-round PCR assay.* Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(9): p. 3196-3200.
105. Feng, Y. and L. Xiao, *Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis.* Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 110-40.
106. Scicluna, S.M., B. Tawari, and C.G. Clark, *DNA barcoding of blastocystis.* Protist, 2006. **157**(1): p. 77-85.
107. Chalmers, R.M. and F. Katzer, *Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis.* Trends Parasitol, 2013. **29**(5): p. 237-51.
108. Xiao, L., *Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update.* Experimental parasitology, 2010. **124**(1): p. 80-89.
109. Tamura, K., et al., *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.* Molecular biology and evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
110. Ramírez, J.D. and F. Guhl, *Molecular epidemiology of parasitic diseases: the chagas disease model*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
111. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data.* The Lancet, 2006. **367**(9524): p. 1747-1757.
112. Pullan, R.L., et al., *Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010.* Parasites & vectors, 2014. **7**(1): p. 37.
113. Forsell, J., et al., *High occurrence of Blastocystis sp. subtypes 1-3 and Giardia intestinalis assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania.* Parasit Vectors, 2016. **9**(1): p. 370.
114. Painter, J.E., et al., *Giardiasis surveillance–United States, 2011-2012.* MMWR Surveill Summ, 2015. **64**(Suppl 3): p. 15-25.
115. Bertrand, I., L. Albertini, and J. Schwartzbrod, *Comparison of two target genes for detection and genotyping of Giardia lamblia in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5940-4.
116. Asher, A.J., L.S. Waldron, and M.L. Power, *Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of Giardia intestinalis in human faeces.* Parasitol Res, 2012. **110**(2): p. 853-8.

117. Boadi, S., et al., *A critical assessment of two real-time PCR assays targeting the (SSU) rRNA and gdh genes for the molecular identification of Giardia intestinalis in a clinical laboratory.* J Clin Pathol, 2014. **67**(9): p. 811-6.
118. Hotez, P.J., et al., *Helminth infections: soil-transmitted helminth infections and schistosomiasis.* 2006.
119. Eligio-Garcia, L., et al., *Frequency of Giardia intestinalis assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene.* Vet Parasitol, 2008. **156**(3-4): p. 205-9.
120. Kohli, A., et al., *Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008. **102**(7): p. 718-25.
121. Lebbad, M., et al., *Dominance of Giardia assemblage B in Leon, Nicaragua.* Acta Trop, 2008. **106**(1): p. 44-53.
122. Minvielle, M.C., et al., *First genotyping of Giardia lamblia from human and animal feces in Argentina, South America.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008. **103**(1): p. 98-103.
123. Arroyo-Salgado, B., et al., *[Genetic profiling of Giardia intestinalis by polimerase chain in human and dogs samples of Colombian Caribean Coast].* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2014. **32**(7): p. 424-7.
124. Rodriguez, V., et al., *[Giardia duodenalis genotypes found in the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar day care centers and dogs in Ibague, Colombia].* Biomedica, 2014. **34**(2): p. 271-81.
125. Helmy, M.M., H.S. Abdel-Fattah, and L. Rashed, *Real-time PCR/RFLP assay to detect Giardia intestinalis genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt.* J Parasitol, 2009. **95**(4): p. 1000-4.
126. Gatei, W., et al., *Multilocus sequence typing and genetic structure of Cryptosporidium hominis from children in Kolkata, India.* Infect Genet Evol, 2007. **7**(2): p. 197-205.
127. Akiyoshi, D.E., et al., *Subtype analysis of Cryptosporidium isolates from children in Uganda.* J Parasitol, 2006. **92**(5): p. 1097-100.
128. Sharma, P., et al., *Genetic diversity of Cryptosporidium isolates from patients in North India.* Int J Infect Dis, 2013. **17**(8): p. e601-5.
129. Stensvold, C.R., et al., *Development and Application of a gp60-Based Typing Assay for Cryptosporidium viatorum.* J Clin Microbiol, 2015. **53**(6): p. 1891-7.
130. Elwin, K., et al., *Cryptosporidium viatorum n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011.* Int J Parasitol, 2012. **42**(7): p. 675-82.
131. Arias, J.A., et al., *Prevalence of intestinal Protozoa in79 Children 2 to 5 years old from a state nursery in Circasia, Quindío.* Infectio, 2010. **14**(1): p. 31-38.

132. Malheiros, A.F., et al., *Short report: Molecular characterization of Blastocystis obtained from members of the indigenous Tapirape ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil.* Am J Trop Med Hyg, 2011. **85**(6): p. 1050-3.
133. Stensvold, C.R., et al., *Terminology for Blastocystis subtypes--a consensus.* Trends Parasitol, 2007. **23**(3): p. 93-6.
134. Stensvold, C.R., M. Alfellani, and C.G. Clark, *Levels of genetic diversity vary dramatically between Blastocystis subtypes.* Infection, genetics and evolution, 2012. **12**(2): p. 263-273.
135. Stensvold, C.R. and C.G. Clark, *Current status of Blastocystis: A personal view.* Parasitol Int, 2016. **65**(6 Pt B): p. 763-771.
136. Yakoob, J., et al., *Blastocystis hominis and Dientamoeba fragilis in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria.* Parasitol Res, 2010. **107**(3): p. 679-84.
137. Wang, W., et al., *Molecular epidemiology of Blastocystis in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia.* Vet Parasitol, 2014. **203**(3-4): p. 264-9.
138. Yan, Y., et al., *Blastocystis sp. subtype 5: a possibly zoonotic genotype.* Parasitol Res, 2007. **101**(6): p. 1527-32.
139. Andersen, L.O.B., et al., *Is supplementary bead beating for DNA extraction from nematode eggs by use of the NucliSENS easyMag protocol necessary?* Journal of clinical microbiology, 2013. **51**(4): p. 1345-1347.
140. Areekul, P., et al., *Trichuris vulpis and T. trichiura infections among schoolchildren of a rural community in northwestern Thailand: the possible role of dogs in disease transmission.* 2010.
141. O'Connell, E.M. and T.B. Nutman, *Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths.* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2016. **95**(3): p. 508-513.
142. Peng, W., et al., *Molecular epidemiological investigation of Ascaris genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA.* Electrophoresis, 2003. **24**(14): p. 2308-2315.
143. Coronato Nunes, B., et al., *Spatial and Molecular Epidemiology of Giardia intestinalis Deep in the Amazon, Brazil.* PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158805.
144. Malheiros, A.F., et al., *Molecular characterization of Blastocystis obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2011. **85**(6): p. 1050-1053.