

**Comparación de la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrongiloidiasis y de una PCR tiempo real en muestras de materia fecal de personas procedentes de zonas de Antioquia y Chocó con diferente grado de riesgo de infección para los helmintos intestinales, 2012-2014.**

**Laura Campo Polanco**

**Universidad de Antioquia  
Escuela de Microbiología  
Medellín  
2014**

**Comparación de la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrongiloidiasis y de una PCR tiempo real en muestras de materia fecal de personas procedentes de zonas de Antioquia y Chocó con diferente grado de riesgo de infección para los helmintos intestinales, 2012-2014**

**LAURA CAMPO POLANCO**

**Tesis para optar al título de Magister en Microbiología y Bioanálisis  
Énfasis en Diagnóstico molecular**

**Tutor:**

Lina A Gutiérrez Builes, Bact. Ph.D.

**Comité Tutorial**

Luz Elena Botero, Bact., MSc., Ph.D.

Jaiberth Cardona Arias, Bact., MSc.

**Universidad de Antioquia**

**Escuela de Microbiología**

**Medellín, Colombia**

**2014**

**Comparación de la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrogiloidiasis y de una PCR tiempo real en muestras de materia fecal de personas procedentes de zonas de Antioquia y Chocó con diferente grado de riesgo de infección para los helmintos intestinales, 2012-2014.**

Laura Campo Polanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de maestría en Microbiología y Bioanálisis con énfasis en diagnóstico molecular. Grupo Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Calle 78 B N° 72 A-109. Medellín, Colombia

**RESUMEN**

**Introducción:** entre los helmintos transmitidos por el suelo contaminado se encuentra *Strongyloides stercoralis*, cuyas características biológicas complejas le permiten desarrollarse al interior del hospedero mediante ciclos de autoinfección, que conlleva al aumento de la carga parasitaria y el riesgo de desarrollo del síndrome de hiperinfección y/o de diseminación de este parásito. La estrogiloidiasis es una enfermedad de difícil diagnóstico debido a la baja excreción parasitaria en las muestras de heces, tendencia a la cronicidad de la infección y baja sensibilidad de las pruebas parasitológicas utilizadas de manera rutinaria en la práctica clínica. Los métodos de biología molecular, basados en la amplificación en cadena de la polimerasa, han sido propuestos como alternativas válidas, confiables y rápidas para la detección de este nematodo, por tener la alta sensibilidad, debido a la capacidad de detectar ADN del parásito en personas con baja carga parasitaria, y no depender de la viabilidad del parásito para su identificación.

**Objetivo:** comparar la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrongiloidiasis y de una PCR tiempo real en muestras de materia fecal de personas procedentes de zonas de Antioquia y Chocó con diferente grado de riesgo de infección para los helmintos intestinales.

**Metodología:** se trata de un estudio de validación de prueba diagnóstica, en el cual se incluyeron muestras de 2 grupos de personas; habitantes de zonas rurales y periurbanas de los departamentos de Chocó, y residentes de una zona periurbana del municipio de Medellín, Antioquia. Mediante una evaluación ciega e independiente de las muestras, se analizaron 129 muestras de materia fecal, utilizando como prueba de referencia un conjunto de métodos de diagnóstico parasitológico: examen directo de heces, concentración de Ritchie modificado, cultivo en placa de agar y el método de Harada-Mori, así como la amplificación del gen 18S ARN ribosomal de *S. stercoralis* mediante PCR en tiempo real. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos y se determinó la validez, el desempeño, la eficiencia global y la concordancia de la qPCR con respecto a los datos obtenidos con los métodos convencionales para el diagnóstico de estrongiloidiasis.

**Resultados:** de 129 muestras incluidas en la investigación, 72 provenían de las zonas rurales del Chocó, 19 de las zonas periurbanas del municipio de Quibdó, y 38 de la zona periurbana del municipio de Medellín. Del total de muestras evaluadas mediante las técnicas parasitológicas tradicionales se detectaron cuatro positivas para *S. stercoralis*, mientras que con la qPCR se detectaron 29 muestras positivas. La qPCR presentó una sensibilidad diagnóstica de 75%, IC (20,07%-100%), especificidad de 79,2% IC (71,68%-86,72%), valor predictivo positivo de

10%, IC (0,0%-23,15%) valor predictivo negativo de 99%, IC (96,55%-100%) cociente de probabilidad positivo 3,61, IC (1,86-6,98) cociente de probabilidad negativo 0,32 IC (0,06-1,73) y un índice J de youden de 0,54. El índice Kappa estimado entre la qPCR y los métodos tradicionales fue de 0,14 (IC95%=-0,016-0,30).

**Conclusiones y perspectivas:** la qPCR evaluada para la detección de *S. stercoralis* utilizando como prueba de referencia un conjunto de métodos de diagnóstico tradicional, en general presentó un desempeño, eficiencia y rendimiento bajo. La sensibilidad diagnóstica de la qPCR fue comparable a los métodos parasitológicos convencionales, aunque presenta la ventaja de detectar el parásito incluso en bajas concentraciones de ADN presente en la muestra. Sin embargo, se debe lograr una mejor optimización de la técnica de extracción de ADN para la eliminación de inhibidores de la amplificación presentes en las muestras de materia fecal, se debe estandarizar un protocolo de concentración de las formas parasitarias como un paso previo a la extracción del ADN genómico y se debe mejorar la linealidad de la qPCR para que pueda ser aplicada como método de diagnóstico cuantitativo de *S. stercoralis*. Adicionalmente, se debe complementar el análisis actual, al evaluar el comportamiento de la prueba en un número mayor de pacientes y en diferentes contextos epidemiológicos y clínicos, adicionales a los evaluados en el presente estudio.

**Palabras Clave:** evaluación, diagnóstico, estrogiloidiasis, PCR en tiempo real, sensibilidad, especificidad, examen directo de heces.

## INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales son un problema de salud pública en los países en vía de desarrollo como Colombia, donde existen condiciones favorables para la transmisión, tales como deficiencias en la prestación de los servicios públicos, hábitos higiénicos sanitarios inadecuados y baja escolaridad en gran parte de la población. Esta situación se evidenció en la Encuesta Nacional de demografía y salud ENDS 2010 (1), y en la última Investigación Nacional de Morbilidad realizada en 1981 por el Instituto Nacional de Salud, donde se encontró que el 81,8% de las personas estaban infectados con parásitos intestinales y particularmente el 1,3% tenía *Strongyloides stercoralis* (2).

*S. stercoralis* es un nemátodo intestinal ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, alcanza una prevalencia global entre 10-40% en población general (3). Este parásito geohelminto presenta un ciclo biológico complejo, el cual alterna entre fases de vida libre, vida parásita y ciclos de autoinfección (4); específicamente para las fases de vida libre, requiere de condiciones de temperatura entre 20°C y 37°C, siendo las temperaturas cercanas a 34°C las que favorecen el desarrollo del estadio infectivo o L3, así como condiciones de alta humedad (5, 6). Estas condiciones ambientales convergen en algunos casos con factores de riesgo que han sido asociados con una mayor prevalencia de esta parasitosis en zonas cálidas y húmedas del mundo, tales como la pobreza extrema, el fecalismo y la presencia de detritos orgánicos en el suelo, favoreciendo el establecimiento de los estadios de vida libre y con ello la permanencia de la infección (5). En Colombia existen regiones geográficas (6, 7),

como la región Pacífica, que presentan las condiciones ambientales óptimas requeridas por el parásito para desarrollar su ciclo de vida, en consecuencia aumentando la probabilidad de infección en la población humana (5, 8). Diferentes estudios han evidenciado la presencia del parásito en algunas zonas del país (9, 10), es el caso de la investigación ejecutada por Torres, *et al.*, (11), en población infantil de Quibdó, Chocó, donde se encontró la presencia de este nemátodo y una elevada tasa de reinfección.

La transmisión de esta parasitosis se da a través del contacto del hospedero humano con el suelo contaminado con larvas filariformes o L3, que penetran la piel intacta o las mucosas, hacen una migración por los tejidos, que incluyen entre otros, los pulmones y posteriormente la hembra partenogénica se establece en el duodeno y el yeyuno a nivel de la mucosa intestinal en las Criptas de Lieberkühn (4, 12). Una característica que hace único a *S. stercoralis* al compararlo con otros nemátodos de importancia médica, es su capacidad de generar ciclos de autoinfección (13). Esta condición se asocia al síndrome de hiperinfección, que es conocido como el proceso de autoinfección intensa, en el cual las larvas rhabditiformes maduran a larvas filariformes en el intestino del hospedero y continúan su ciclo de vida sin necesidad de contacto con el ambiente (14, 15). Esta capacidad de autoinfección por parte del parásito, se ha encontrado fuertemente relacionada con alteraciones de la respuesta inmune de tipo celular por parte del hospedero, como ocurre en las coinfecciones con el virus linfotrópico de células T (*Human T-lymphotropic virus 1* HTLV-1) y en los tratamientos prolongados con corticosteroides (16-18). Esto ha hecho que *S. stercoralis* se

considere un parásito oportunista bajo estas condiciones clínicas, llevando al desarrollo de complicaciones como la colecistitis, pancreatitis meningitis, endocarditis y septicemia, que pueden ser fatales en este tipo de pacientes. Aunque este tipo de complicaciones clínicas no son causadas directamente por el parásito, sino por infecciones bacterianas potenciadas por la migración larvaria, son bastante probables pues el aumento de la carga parasitaria conlleva a una mayor probabilidad de diseminación de las larvas desde el intestino a través del cuerpo (19).

La infección con *S. stercoralis* puede permanecer latente por periodos largos de tiempo, sin que se presenten manifestaciones clínicas, y obviamente sin un diagnóstico etiológico certero (19). En este sentido, los pacientes que son sometidos a tratamientos prolongados con corticosteroides, se convierten en un grupo de riesgo para el desarrollo del síndrome de hiperinfección y diseminación, en el caso específico de tener una infección crónica no tratada, debido a que los esteroides tienen la capacidad de reducir el número de linfocitos Th2, el de eosinófilos y varias interleucinas mediadoras de la respuesta inmune frente parásitos, al igual que pueden estimular la maduración de las larvas rhabditiformes a filariformes e incrementar la fecundidad de las hembras partenogénicas (3). Estas condiciones clínicas justifican cualquier esfuerzo de diagnóstico temprano y certero de esta parasitosis, para evitar el riesgo de hiperinfección en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora o con coinfección por el virus linfotrópico de células T, y así garantizar la instauración de un tratamiento efectivo que evite la aparición de complicaciones graves e incluso mortales en estos grupos de riesgo.

El diagnóstico de la infección por *S. stercoralis* se basa fundamentalmente en la identificación de los estadios larvarios del parásito y éste puede efectuarse mediante varios métodos, entre los que se encuentran el examen directo de heces recién emitidas, la concentración de Ritchie modificado, el aislamiento o cultivo en placa de agar, y los métodos de separación de larvas Harada-Mori y Baermann (14), entre otros. El examen directo en heces es el que se utiliza de manera rutinaria en los laboratorios clínicos, debido a la sencillez y rapidez que presenta el procesamiento de las muestras. Sin embargo, en un metanálisis publicado recientemente (Anexo 1) se demostró que esta prueba y el método de Ritchie modificado, presentan bajo desempeño, eficiencia y baja seguridad diagnóstica en la detección de *S. stercoralis*, demostrando mediante este parámetro la poca capacidad de la prueba de predecir la presencia o ausencia de la infección (20), mientras que los métodos de Baermann y el cultivo en placa de agar presentan mayor utilidad diagnóstica, aunque son más laboriosos y en el caso del cultivo en placa de agar, se requieren entre dos y siete días para generar un resultado confiable (21, 22).

Con el fin de mejorar el diagnóstico de la estrogiloidiasis varios investigadores han propuesto las técnicas de biología molecular basadas en la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) como alternativas válidas, confiables y rápidas para la detección de este nemátodo (23-30). En comparación con las pruebas tradicionales de diagnóstico parasitológico, los métodos moleculares presentan ventajas, como la capacidad de detectar un escaso número de formas parasitarias y no depender de la viabilidad del parásito para su identificación, al detectar

específicamente el material genético del helminto, incluso si se encuentra como ADN libre en la muestra analizada (31). No obstante, al analizar con detalle la mayoría de las técnicas de PCR desarrolladas hasta la fecha, se observa que presentan algunas deficiencias asociadas a su evaluación como pruebas diagnósticas de la estrongiloidiasis, debido a que solo pasaron por la fase de estandarización de la técnica, al incluir exclusivamente muestras de materia fecal provenientes de personas con diagnóstico previo de estrongiloidiasis, con síntomas gastrointestinales o solo de personas procedentes de zonas donde la prevalencia de esta parasitosis es conocida como elevada. Además, solo se encuentra reportada la validez interna de la prueba, omitiendo la valoración de otros parámetros importantes en la toma de decisiones clínicas (32-34), tales como el desempeño expresado en la sensibilidad de la prueba y los valores predictivos, así como la eficiencia (que evidencia el porcentaje de pacientes correctamente diagnosticados) y la seguridad diagnóstica (que demuestra la capacidad de la prueba para predecir la presencia o ausencia de infección) (35).

Sumado a lo anterior, se debe tener presente que la prevalencia de la infección varía entre diferentes zonas y ésta puede modificar algunos parámetros de la evaluación diagnóstica, por lo que resulta necesario analizar la utilidad diagnóstica de las pruebas en diversos contextos (32, 34, 36), aún más si se tiene en cuenta que en Colombia no existen estudios de comparación y evaluación de pruebas para diagnóstico de las parasitosis intestinales de importancia médica, no solo para los métodos convencionales, sino para las pruebas moleculares, que puedan mejorar la detección de las parasitosis intestinales de difícil diagnóstico. En este

sentido, el presente trabajo de investigación se propuso comparar la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrongiloidiasis y de una PCR en tiempo real para detección de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal procedentes de zonas de Antioquia y Chocó con diferente grado de riesgo de infección para los helmintos intestinales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio es de validación de prueba diagnóstica. Los procedimientos realizados no presentaron ningún riesgo, ya que durante su ejecución se cumplieron los principios éticos fundamentales que regulan la conducta ética, regidos por El Código de Núremberg (1947), la Declaración de Helsinki (promulgada en 1964 y enmendada en Corea en 2008), y la norma nacional 008430 para la investigación en salud. Además, contó con la aprobación del comité de investigación en salud de la Universidad Pontificia Bolivariana.

El presente trabajo se desarrolló en dos fases. Una inicial que consideró la estandarización de un protocolo de PCR en tiempo real de tipo cualitativo, lo que significa que permite solo la detección de la presencia o ausencia de *S. stercoralis* mediante el análisis de ADN genómico extraído de muestras de materia fecal por la ampliación de la secuencia parcial del gen 18S del ARN ribosomal usando cebadores específicos para este parásito, y en la segunda fase de esta investigación se comparó la utilidad diagnóstica de cuatro métodos convencionales de diagnóstico de la estrongiloidiasis y de dicha PCR en tiempo

real para la detección de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal de personas habitantes de Antioquia y Chocó.

## **1. PRIMERA FASE: ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Strongyloides stercoralis***

### **1.1 Controles positivos usados en las pruebas moleculares**

Durante el proceso de estandarización y la fase de validación de la qPCR, se utilizaron 4 muestras de materia fecal, donadas por una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín, en las cuales se determinó la presencia de larvas rhabditiformes de *S. stercoralis* mediante examen directo de heces, descartando mediante este mismo método la presencia de otros parásitos intestinales patógenos o comensales. La muestra control positivo codificada en este estudio como SF1 era procedente de un paciente con un síndrome de hiperinfección (un indicador de ello es que al examen directo se podían observar varios estadios del parásito); mientras que los controles positivos codificados como SF2, SF3 y SF4 aunque no procedían de pacientes con hiperinfección, tenían cargas parasitarias altas, determinadas por la visualización de entre dos y cinco larvas por campo. A estas muestras no se les adicionó ningún tipo de preservante y se almacenaron a -20°C hasta la extracción de ADN genómico.

### **1.2 Elección de un protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestras de materia fecal**

Aunque diferentes casas comerciales ofrecen estuches específicos para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de materia fecal, en la fase

inicial del presente estudio se realizó una revisión de los artículos originales cuyo objetivo había sido la estandarización de protocolos para la detección de parásitos intestinales en muestras de materia fecal usando pruebas moleculares, y se encontró que en la mayoría de ellos usaban protocolos de extracción diferentes a los ofrecidos de manera específica para este propósito por las casas comerciales (26). En este sentido, para seleccionar un buen método de extracción de ADN genómico, que permitiera la ejecución del presente trabajo, se compararon dos estuches comerciales encontrados ampliamente referenciados (24, 25, 28, 29, 37) para propósitos similares al del presente estudio: QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania) y QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania). Se realizó la extracción independiente de ADN genómico de las cuatro muestras de materia fecal positivas para *S. stercoralis*, conservando las condiciones de preservación a -20°C hasta el momento justo en que se inició el proceso de extracción, con el objetivo de comparar y seleccionar el método más eficiente en términos de calidad y cantidad del ADN extraído a partir de este tipo de muestras. Para ambos métodos se realizó la extracción a partir de 100mg de materia fecal. El método comercial QIAamp DNA Stool se aplicó siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante y para el QIAamp DNA Mini Kit se emplearon las modificaciones reportadas por Basuni, *et al.*, (26), que sugieren la adición de 200µl de PBS (pH 7,2) al 2% de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP; Sigma, Steinheim, Alemania) y la incubación de la muestra a 100°C durante 10 minutos, después de este tratamiento se adicionó 200 µl de buffer de lisis suministrado en el kit de extracción (ATL) y 40 µl de Proteinasa K a la mezcla y se incubó a 56°C durante toda la noche, posteriormente se aplicó el protocolo como lo especifica el

fabricante. Cada muestra (control positivo) fue extraída por triplicado empleando las mismas condiciones en cada protocolo utilizado. Para verificar la concentración de ADN (ng/μl) y el índice de pureza (A260/A280) obtenidos en cada uno de los ensayos, el ADN obtenido fue analizado en el equipo NanoDrop 2000c® (Thermo Scientific, USA), y a partir de dichos datos se calcularon promedios y desviaciones estándar (DE) para la concentración de ADN obtenida y el índice de pureza de cada método de extracción por separado y se realizó análisis estadístico empleando el software SPSS versión 21. Adicionalmente, se realizaron diluciones en base 10 a una de las muestras extraídas con cada protocolo para determinar la presencia de inhibidores de la PCR, mediante la comparación de los valores de Ct obtenidos, tanto para la detección molecular del parásito como para el control positivo interno (IPC) usado en el protocolo de PCR en tiempo real (ver descripción a continuación).

### **1.3 Análisis de la especificidad analítica *in silico* y mediante PCR convencional de los cebadores elegidos para la amplificación del gen 18S del ARN ribosomal**

Para la amplificación específica del gen 18S del ARN ribosomal de *S. stercoralis* se empleó un par de cebadores reportados por Verweij, *et al.*, (24) (Tabla 1). Para la selección inicial de estos cebadores se consideró el hecho de su aplicación en distintas zonas geográficas e incluso su incorporación en un método pentaplex de PCR en tiempo real para detección de geohelminths, lo que de alguna manera sugería la especificidad de los cebadores y la ausencia de reacciones cruzadas con otros parásitos, que también son de alta importancia en nuestro medio, como

son uncinarias (*Ancylostoma duodenale/Necator americanus*) y *Ascaris lumbricoides* (26). Adicionalmente, la especificidad de los cebadores se verificó mediante varias herramientas bioinformáticas y con procedimientos de laboratorio, tal como se explica a continuación. Inicialmente se llevó a cabo un análisis de identidad de las secuencias de los cebadores usando el programa Nucleótido-BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI), posteriormente se efectuó el análisis de la calidad del diseño de estos en el software Oligoanalyser 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc), seguido de una simulación de amplificación mediante una PCR electrónica en el software FastPCR 6.5, (PCR *in silico*).

Previo a la implementación del procedimiento de PCR en tiempo real, se realizó una PCR convencional en el termociclador T100™ (Thermal Cycler, de BIO-RAD, USA), amplificando los controles positivos descritos anteriormente con el objetivo de verificar el tamaño del amplicón y obtener un producto de PCR purificado para realizar secuenciación bidireccional. Las condiciones de la PCR se emplearon como las describen Basuni, *et al.*, (19), aplicando algunas modificaciones en los parámetros de concentración final de los cebadores (200nM) y con la disminución del número de ciclos de 50 a 35. El producto de amplificación por PCR de los cuatro controles positivos fue enviado para secuenciación bidireccional en MACROGEN USA (Maryland, USA). Las secuencias obtenidas fueron editadas en el software *Chromas Lite* versión 2.1.1 y alineadas en el programa *BioEdit* (*Biological Sequence Alignment Editor*) versión 7.1.9, posteriormente se determinó el porcentaje de identidad al comparar las secuencias de *S. stercoralis* obtenidas

de los controles positivos frente a las secuencias reportadas en el NCBI mediante un análisis BLASTn.

#### **1.4 Amplificación del gen 18S de la subunidad pequeña de ARN ribosomal mediante qPCR y evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica**

En la qPCR se usaron los cebadores descritos previamente para la amplificación del gen 18S del ARN ribosomal de *S. stercoralis* y una sonda TaqMan (Custom TaqMan® MGB Probes, Applied Biosystems®, USA) con una secuencia de 19 nucleótidos específica para *S. stercoralis*, marcada con FAM™ y descrita por Basuni, *et al.*, (26) empleando el kit comercial de Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la optimización de los parámetros de la qPCR para diagnóstico de *S. stercoralis* se realizaron modificaciones utilizando gradientes de concentración para los cebadores y para la sonda. Para mejorar el rendimiento de la amplificación se adicionó Albúmina de suero bovino (Thermo Scientific Bovine Serum Albumin, BSA) y Dimetil Sulfoxido (DMSO) a una concentración final de 0,1mg/ml y 1%, respectivamente. Adicionalmente en todas la pruebas se introdujo un ADN exógeno o IPC (TaqMan® Exogenous Internal Positive control, Applied Biosystems®, USA) como control positivo interno de la reacción con el fin de evaluar la presencia de inhibidores en las muestras de materia fecal, mientras que el control negativo utilizado fue agua ultrapura. El proceso de optimización de la qPCR para la detección de *S. stercoralis* se llevó a cabo en el termociclador *ABI Applied Biosystem 7500 fast* (Applied Biosystem, USA).

Para la estimación de la sensibilidad analítica, a partir de una muestra de materia fecal positiva para *S. stercoralis* e identificada previamente mediante el método de Ritchie modificado, se realizó un cultivo en placa de agar con el fin de obtener estadios larvarios del parásito. Después de evaluar la positividad del cultivo usando un estereomicroscopio, se realizó un lavado de la superficie de la placa de agar con PBS (*Phosphate buffered saline*) pH7 y se llevó a cabo el recuento de larvas en una cámara UniSYSTEM™ SLIDE-10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Posteriormente fue retirada la muestra de cada pozo que contenía una larva, dos larvas y cuatro larvas, y cada una fue depositada en un vial de 1,5 mL para la extracción de ADN, verificando mediante visualización microscópica la transferencia de las larvas a cada vial. El producto de la extracción fue cuantificado en el NanoDrop 2000c® (Thermo Scientific, USA) y a partir de la muestra con cuatro larvas de *S. stercoralis* con la concentración de ADN 2,6ng/μl, se realizaron diluciones seriadas en base 10. Finalmente para cada concentración de ADN se realizaron 4 repeticiones de qPCR, para evaluar la reproducibilidad de los ensayos.

En la determinación de la especificidad analítica de la qPCR diseñada para la detección de *S. stercoralis* se evaluó la existencia de reacciones cruzadas con otros parásitos intestinales, mediante el procesamiento un grupo de 16 muestras de materia fecal caracterizadas mediante detección microscópica, empleando coprológico directo y concentración de Ritchie modificada. Se seleccionaron muestras que contenían geohelminos y se procesaron mediante qPCR muestras

positivas para *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus* y para *Hymenolepis nana*. Asimismo, se determinó la reactividad cruzada con *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia intestinalis* e *Iodamoeba bütschlii*. También se emplearon muestras con poliparasitismo por *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *A. duodenale*/*N. americanus* e *H. nana* y algunos otros protozoos patógenos y comensales. Se realizaron 3 repeticiones de este ensayo.

### **1.5 Determinación de la reproducibilidad de la qPCR**

Para determinar la eficiencia de la reacción de qPCR y verificar la linealidad del método (con el fin de evaluar su potencial como método cuantitativo) se construyó una curva estándar, a partir de una muestra de ADN genómico obtenido de una muestras de materia fecal, realizando diluciones seriadas en base 10 a partir de una concentración de ADN de 24,8 ng/μL hasta  $2,48 \times 10^{-15}$  ng/μL, se realizaron tres replicas por dilución en la misma reacción de qPCR, y se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la eficiencia de la prueba, con el software 7500 *fast* v2.0.5 (ABI Applied Biosystem, USA), además se verificó dicho calculo usando el programa SPSS versión 21 (40).

Para evaluar la reproducibilidad se emplearon las mismas diluciones en base 10 descritas anteriormente, y se realizaron 3 reacciones de qPCR en un mismo día para determinar la reproducibilidad intra-ensayo, y en 3 días diferentes para comprobar la reproducibilidad inter-ensayo. Los productos amplificados mediante qPCR en uno de los ensayos fueron analizados en una electroforesis en gel de

agarosa al 2% y Gelred (Thermo Scientific, USA) para la visualización de las bandas de ADN, con el fin de verificar la presencia del producto de PCR esperado.

## **2. SEGUNDA FASE: COMPARACIÓN DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CUATRO MÉTODOS CONVENCIONALES DE DIAGNÓSTICO DE LA ESTRONGILOIDIASIS Y DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *S. stercoralis***

### **2.1 Población de estudio para la comparación de la utilidad diagnóstica de las pruebas en estudio**

La selección de los participantes para esta fase de la investigación, se realizó mediante un muestreo por conveniencia. Para esto se determinó como tamaño mínimo de la muestra, un número de 100 personas, 50 habitantes de zonas rurales del Chocó y 50 personas de las zonas rurales y periurbanas del departamento del Chocó y del departamento de Antioquia. Estas condiciones se tuvieron en cuenta con el fin de tener una primera aproximación al proceso de validación de la qPCR en un espectro apropiado de pacientes, similares a aquellos en los que se aplicaría la prueba en la práctica clínica.

La población que constituyó los grupos para la evaluación de la prueba de qPCR fue conformada por individuos mayores de edad, de ambos géneros, habitantes por más de un año en las zonas seleccionadas, que desearon participar libremente en el estudio, y que firmaron el consentimiento informado, los cuales se distribuyeron en dos grupos de participantes. Se incluyeron a todos los individuos adultos que cumplieron con los criterios de inclusión previamente establecidos y que desearon participar en el estudio.

El primer grupo, fue conformado por personas residentes en zonas rurales del departamento del Chocó, específicamente las comunidades indígenas Emberá del kilómetro 18 y 20 de la carretera Quibdó-Medellín, en donde habitaban cerca de 80 familias indígenas que no contaban con acceso a agua potable ni tampoco con un sistema de disposición de excretas. De igual manera, fueron incluidos participantes de las veredas de El consuelo y Quebrada bonita del municipio de Carmen de Atrato, Chocó, zona que presentaba las mismas características, es decir, comunidades indígenas y afrocolombianas, habitantes de zonas rurales del Chocó, quienes no contaban con una red de servicios sanitarios (Figura 1).

El segundo grupo estuvo conformado por individuos residentes de barrios periféricos o de las zonas periurbanas de las cabeceras municipales de Quibdó y de Medellín (Barrio Versalles II y La Cruz ), donde contaban con algunos servicios de saneamiento básico, como son agua que llega por tuberías y disposición de excretas (Figura 1).

A cada persona que aceptó participar de este estudio y firmó el consentimiento informado se le realizó una encuesta para la exploración de variables epidemiológicas y condiciones higiénico-sanitarias, esta fue diseñada con una redacción clara y coherente, sin condicionar las respuestas de los participantes. Antes de la aplicación de la encuesta a los participantes se realizó una prueba piloto para probar el diseño de dicha encuesta. Los datos obtenidos fueron

consignados en hojas de cálculo de Excel (Microsoft Excel, 2010), para su posterior análisis.

## **2.2 Descripción de los métodos parasitológicos tradicionales empleados como patrón de referencia**

Para garantizar la fiabilidad y la validez en los resultados obtenidos en cuanto a la lectura de los diferentes métodos de diagnóstico parasitológico y para disminuir el error en la medición debido a la variabilidad en las observaciones, se estimó la magnitud de la variabilidad inter-observador, mediante un estudio de concordancia, que permitió medir la fuerza de la correlación entre los dos observadores implicados en la lectura de las muestras de materia fecal (38, 39). Para tal fin se recolectaron 44 muestras de materia fecal de personas residentes en el barrio La Cruz, ubicado en la zona nororiental del municipio de Medellín. Cada muestra fue procesada por dos observadores de manera independiente, analizando un montaje diferente de cada una de las muestras, tanto para el examen directo de heces como para la concentración de Ritchie modificado y para el cultivo en placa de agar. Los resultados del análisis parasitológico de las muestras por cada método y por evaluador de manera individual, fueron exportadas a SPSS versión 21 (40) y Epidat versión 3.1 (41) para el análisis de los datos mediante la determinación del índice Kappa no ponderado, comparando los resultados obtenidos por cada observador, en cada una de las pruebas por separado.

Ante la ausencia de un único método de diagnóstico que se pueda emplear como prueba de referencia para la detección de *S. stercoralis*, la muestra de materia fecal de cada individuo que participó en el estudio de validación de la qPCR se analizó utilizando cuatro métodos parasitológicos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (42). La combinación de diferentes métodos convencionales de diagnóstico, permitió obtener mayor seguridad en los resultados de las muestras analizadas, por lo que la prueba de referencia la constituyó el conjunto de métodos de diagnóstico tradicional conformado por: examen directo de heces (coprológico), método de concentración formalina-eter (Técnica de Ritchie modificada), cultivo en placa de agar y el método de Harada-Mori, cuyos fundamentos y procedimientos se describen a continuación. Una muestra se clasificó como positiva para estrongiloidiasis si el parásito era detectado por al menos uno de los cuatro métodos de diagnóstico tradicionales que se aplicaron en conjunto como prueba de referencia, independiente de si esta visualización se evidenció por uno o ambos observadores, encargados del análisis parasitológico de las muestras.

**-Examen directo de heces (Coprológico):** este método se basa en la identificación, macroscópica y microscópica de elementos parasitarios presentes en la materia fecal. Para la identificación microscópica se colocó en un portaobjetos una gota de solución salina isotónica al 0.85% estéril y una gota de solución yodada (Iugol). Luego con un palillo de madera se homogenizó la muestra, se tomó aproximadamente 2mg con la punta del palillo y se mezcló inicialmente en la solución salina y luego en Iugol. Finalmente se colocó sobre

cada gota un cubre-objetos y se procedió a la lectura del montaje en búsqueda de parásitos intestinales recorriendo las dos preparaciones de una forma sistemática, utilizando el objetivo de 10X y de 40X (4). El informe de resultados fue consignado como presencia/positivo o ausencia/ negativo para larvas de *S. stercoralis*.

**-Método de Concentración Formalina-éter (Técnica de Ritchie modificada):** se basa en la concentración de las formas parasitarias mediante la centrifugación, utilizando formalina y éter para separar y mejorar la visualización los elementos parasitarios. En este procedimiento se homogenizó aproximadamente 1g de la muestra de heces en 10 mL de solución de formalina al 10%, en un tubo de vidrio de 15 mL. Luego de 5 minutos la suspensión de materia fecal se hizo por una gasa doble en un embudo, permitiendo el paso del filtrado en otro tubo de 15 mL. Después se agregaron 3 mL de éter, se tapó el tubo y se mezcló fuertemente durante 30 segundos y con cuidado se permitió la salida del vapor que se forma luego del procedimiento. Seguidamente se centrifugó a 2000 RPM durante dos minutos, se retiraron las capas superiores que contienen éter y los restos de alimentos de la materia fecal. Con el sedimento se hicieron preparaciones en fresco con solución salina y con lugol, tal como se describió para el montaje del coprológico, utilizando el objetivo de 10X y 40X en busca de parásitos intestinales. El informe de resultados fue consignado como presencia/positivo o ausencia/ negativo para larvas de *S. stercoralis*.

**-Aislamiento de *Strongyloides stercoralis* en placas de agar o Cultivo en placa de agar (CPA):** se fundamenta en la observación de las huellas

serpentiginosas visibles sobre la superficie del medio sólido, debido a la diseminación de bacterias que arrastran las larvas en la superficie de su cuerpo (14). Esta técnica consiste en el empleo de agar nutritivo en cajas de petri para la siembra de materia fecal fresca. Se procedió de la siguiente manera: se tomaron aproximadamente 2g de materia fecal y se depositaron en el centro del agar, luego se sellaron las cajas por la parte externa utilizando PARAFILM® (BRAND-GMBH, Alemania) y se dejaron a temperatura ambiente (25°C-33°C) durante 2 días. Pasado este tiempo observó macroscópicamente el agar y luego con la ayuda de un estereoscopio en busca de la formación de marcas que indicaran el desplazamiento de las larvas. Luego se agregó formol al 10% lavando la superficie del agar, dicho material de lavado se recolectó y se dispuso en un tubo, centrifugó a 2000 rpm durante dos minutos y se observó en el microscopio el sedimento para la identificación de larvas. En caso de encontrar resultados negativos a los dos días, se dejó a temperatura ambiente por 5 días más. Este método es positivo si se observó el rastro dejado por el desplazamiento de las larvas, y es positivo para *S. stercoralis* si se hizo la identificación de las características morfológicas de las larvas mediante microscopía de luz. Es de resaltar que este método requiere de la viabilidad de los parásitos para obtener resultados positivos.

**-Método de Harada-Mori:** reproduce en el laboratorio parte del ciclo de vida libre del parásito, permitiendo además la identificación de larvas de helmintos con base en sus características morfológicas (14), su sensibilidad es discutida variando entre 24% y 100% (43-45). En el laboratorio se procedió de la siguiente manera: las heces frescas fueron esparcidas en un papel de filtro de 1,5 cm de ancho, el

extremo inferior de aproximadamente 2 cm se mantuvo limpio y se sumergió en agua dentro de un tubo de ensayo de 15 mL, haciendo que por capilaridad, el papel se humedezca e induzca a la larva a migrar hacia el fondo del tubo. Después de 4 días de incubación se realizó la observación microscópica. Al igual que el CPA, este método requiere de la viabilidad de los parásitos para obtener resultados positivos.

### **2.3 Condiciones de recolección, transporte y almacenamiento de las muestras de materia fecal analizadas mediante métodos tradicionales y qPCR**

A cada individuo que aceptó participar en el estudio, se le entregó un frasco tapa rosca estéril, y se le indicó que debían coleccionar la muestra de manera espontánea, evitando el uso de laxantes y la contaminación con orina o con residuos del medio ambiente. Las muestras provenientes del Chocó, tanto de la zona rural como de la zona periurbana, fueron transportadas sin refrigeración; sin embargo, cada muestra se distribuyó en tres alícuotas: a) en un vial de 1,5 mL para ser almacenada a -20°C de manera inmediata a la llegada al laboratorio en la ciudad de Medellín para hacer la extracción de ADN genómico requerido para el procesamiento posterior mediante la qPCR; b) una segunda alícuota se preservó con formalina al 10% y se empleó para la ejecución de los análisis parasitológicos convencionales no dependientes de la viabilidad del parásito (Coprológico y Técnica de Ritchie modificada) y c) la tercera alícuota sin preservante se empleó en los métodos dependientes de la viabilidad del parásito (CPA y Método de Harada-Mori). En el caso de las muestras procedentes de los barrios periféricos de Medellín, La cruz y Versalles número II, aunque fueron procesadas mediante los cuatro métodos

parasitológicos convencionales aproximadamente a las dos horas posteriores a su recolección, en el laboratorio se realizaron dos alícuotas de cada muestra, una se preservó con formalina al 10% y otra fue almacenada a -20°C hasta la extracción de ADN genómico y el procesamiento mediante la qPCR.

Como criterios de validez interna de este estudio, a cada muestra recolectada se le realizaron ambas metodologías (las cuatro pruebas de diagnóstico tradicional y la qPCR) y el procesamiento de cada una de las muestras y la comparación de resultados se realizó a ciegas e independiente del resultado obtenido con cada uno de los métodos de diagnóstico parasitológico convencionales, considerados en conjunto como el patrón de referencia para esta fase del estudio. Las muestras de materia fecal se procesaron por duplicado mediante qPCR aplicando el procedimiento estandarizado previamente, y se realizó la comparación intra-sujeto e intra-grupo, confrontando el resultado de la qPCR obtenido para cada participante contra el resultado obtenido mediante el patrón de referencia en el mismo sujeto.

Para determinar de manera complementaria a los ensayos realizados durante la fase de estandarización, si la concentración de ADN genómico extraído del parásito presente en las muestras de materia fecal detectadas como positivas en este estudio influía de manera directa sobre los resultados obtenidos en la qPCR en lo referente a los valores de Ct, dos muestra de ADN clasificadas como positivas para *S. stercoralis* (con valor de Ct de 28 y 29) y dos muestra clasificadas como negativas fueron mezcladas (una muestra positiva, con una

muestra negativa) en una relación 1:1, con el fin de estimar los cambios ocurridos en el valor de Ct, a medida que aumentaba la concentración de ADN en dicha reacción. Así mismo, como alternativa al uso del reactivo IPC para evaluar la presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras con resultado indeterminado (30,00-34,99) y negativo, una muestra de concentración conocida con resultado indeterminado y valor de Ct de 32,25 y una muestra de concentración conocida, con resultado negativo y con valor de Ct de 39,78, seleccionadas al azar, fueron sometidas a diluciones seriadas en base 10, este ensayo permitiría analizar si existía un cambio significativo en el valor de Ct, que indicara que la muestra había sido clasificada de manera incorrecta.

#### **2.4 Análisis de filogenia basado en secuencias parciales del gen 18S de la subunidad pequeña de ARN ribosomal**

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos mediante la qPCR en esta fase de la investigación, se seleccionó de manera aleatoria un producto de qPCR de una de las muestras positivas y de uno de los controles positivos con el fin de verificar la identidad de la secuencia específica para el gen 18S ARNr de *S. stercoralis*. Adicionalmente, se realizó una PCR convencional para amplificar un segmento parcial de 244 pb del gen 18S del ARN ribosomal empleando un par de cebadores para amplificar una región parcial de este mismo marcador molecular (Tabla 1), pero diferentes a los empleados en la qPCR (27). Se seleccionaron de manera aleatoria siete de las muestras que habían sido clasificadas como positivas, tres muestras clasificadas como indeterminadas y tres de los controles

positivos usados en todo el trabajo de investigación y realizar la secuenciación bidireccional del producto de PCR en MACROGEN USA (Maryland, USA).

Las secuencias de ADN resultantes de la secuenciación bidireccional de cada producto de PCR fueron editadas y alineadas en el programa Geneius® versión 7.1.7 (46) para la obtención de la secuencia consenso con la cual se realizó la verificación de la identidad de cada una mediante análisis BLASTN en el GenBank ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de filogenia molecular para las secuencias parciales de la región 18S del ARN ribosomal obtenidas en este estudio y secuencias reportadas en el NCBI para geohelminthos y varias especies del género *Strongyloides*, con un análisis de Máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*). Previo al análisis en el programa MEGA versión 6 (47), se realizó una selección del modelo de evolución molecular para esta región teniendo en cuenta el criterio de información bayesiano (BIC) y el criterio de información de Akaike corregido (AICc). La estimación del dendograma se realizó mediante búsqueda heurística y un remuestreo por Bootstrap con 1.000 pseudoreplicas. Además, usando el mismo modelo de evolución molecular seleccionado previamente para las secuencias parciales de la región 18S del ARN ribosomal usando el programa MrBayes versión 3.2.2 usando el plugin disponible en Geneius® versión 7.1.7 (46).

## **Análisis de datos**

Todos los datos obtenidos en este trabajo se tabularon en Excel (Microsoft Excel, 2010) y fueron sometidos a un control de calidad previo al análisis, para verificar consistencia de los datos y errores en la digitación. En el caso de los resultados obtenidos en las lecturas para el análisis inter-observador, estos fueron tabulados por una persona diferente a las involucradas en la lectura de las muestras y fueron exportados a SPSS versión 21 (40) y Epidat versión 3.1 (41) para determinar el índice Kappa.

Los datos obtenidos de la encuesta sociodemográfica, así como los resultados de las muestras analizadas con las diferentes metodologías, fueron exportados al software SPSS versión 21 (40), para la descripción de los datos epidemiológicos y parasitológicos mediante análisis descriptivo de las variables cuantitativas y análisis de frecuencias. Los resultados de las pruebas convencionales y de la qPCR se consignaron como valores dicotómicos (prueba positiva/prueba negativa) y se analizó en qué grado el método de diagnóstico por qPCR permitió distinguir entre pacientes con estrongiloidiasis y sin estrongiloidiasis, mediante la estimación de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el cociente o razón de probabilidades (Likelihood Ratio), entre otros parámetros. Para tal fin se empleó el programa Epidat 3,1 (41), específicamente para las tablas 2x2 en donde se distribuyeron los resultados obtenidos con ambas metodologías. Además se evaluó la concordancia entre los resultados mediante la estimación del Índice Kappa.

## RESULTADOS

### 1. ESTANDARIZACIÓN DE LA qPCR

#### 1.1 Extracción de ADN genómico

El kit de extracción de ADN genómico que mostró mejores resultados en cuanto al índice de pureza del ADN obtenido luego del procedimiento fue QIAamp ADN Mini Kit de QIAGEN® (Qiagen, Hilden, Alemania), con las modificaciones en el protocolo reportadas por Basuni, *et al.*, (26). El promedio de la concentración de ADN y la pureza para los cuatro controles positivos extraídos con QIAamp DNA Stool Mini Kit QIAGEN® (Qiagen, Hilden, Alemania) fue de 26,8 ng/μl, 55,3 ng/μl, 3,5 ng/μl y 2,3 ng/μl y 1,33; 2,2; 2,1 y 2,8, respectivamente. Las muestras extraídas con QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN® (Qiagen, Hilden, Alemania) con las modificaciones por Basuni, *et al.*, (26), tuvieron una concentración de ADN y pureza de 14,9 ng/μl, 25 ng/μl, 10,1 ng/μl y 25 ng/μl y 1,8; 2; 1,7 y 1,6 respectivamente. En cuanto a la comparación de resultados obtenidos con cada método, no hubo diferencias significativas en cuanto a la concentración de ADN obtenida por ambos métodos, pero sí hubo diferencias en cuanto al índice de pureza del ADN extraído (Tabla 2). También se observaron diferencias en el valor de Ct (*cycle threshold*, número de ciclo de la PCR en que se detecta el producto amplificado) obtenido en la qPCR para una misma muestra control positivo (analizada por duplicado) extraída con ambos métodos (Figura 2). En cuanto a las muestras extraídas con QIAamp DNA Stool Mini Kit QIAGEN® (Qiagen, Hilden, Alemania), cuyo Ct fue de 33, al realizar una dilución de esta muestra no se

evidenciaron cambios significativos en el valor de Ct obtenido en comparación con el valor de Ct de la muestra sin diluir.

## **1.2 Especificidad analítica *in silico* y amplificación del gen 18S de la subunidad pequeña de ARN ribosomal mediante PCR convencional**

El análisis de especificidad de los cebadores estimado mediante BLASTn mostró 100% de identidad con secuencias parciales del gen 18S de la subunidad pequeña del ARNr reportadas en el GenBank para *S. stercoralis*, con códigos de acceso KF926661 y KF926662 correspondientes a especímenes del parásito aislados en Camboya (48).

El Tm básico de cada cebador fue de 54,2°C y 56,5°C, y la temperatura de alineamiento estuvo entre 60°C y 64°C. No se evidenció formación de bucles ni dímeros de cebadores. Los resultados de la PCR electrónica mostraron el sitio exacto de hibridación de los cebadores en secuencias parciales y en la secuencia completa del gen 18S de la subunidad pequeña del ARNr de *S. stercoralis* reportadas en la página de NCBI (Tabla 1). Correspondiendo la unión del primer Forward a los nucleótidos en la posición 1548-1575 y el Reverse en la posición 1626-1648 en la secuencia completa del gen 18S de *S. stercoralis* reportada por Putland, *et al.*, (49), con código de acceso en el GenBank M84229.1 y en la secuencia parcial reportada por Dorris, *et al.*, (50) con código de acceso en el GenBank AF279916.2

El análisis de las secuencias parciales del gen 18S de la subunidad pequeña de ARNr obtenidas mediante PCR convencional para los controles positivos (SF1, SF2, SF3 y SF4) presentó un porcentaje de identidad entre 97 y 100% con secuencias de este mismo marcador molecular reportadas para *S. stercoralis*, en especímenes procedentes de las secuencias completas reportadas por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) en el GenBank con código de acceso M84229.1 (50), y para la secuencia parcial con código de acceso KF926662.1 reportada por *Schar, et al.*, (48), en aislados de este nemátodo en Camboya.

### **1.3 Evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica de la qPCR**

El procedimiento de qPCR se estandarizó en un volumen de reacción final de 25 µl, utilizando las concentraciones que se describen en la tabla 3. El perfil térmico utilizado en la qPCR fue: un paso inicial de pre-PCR a 60°C por 1 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C por 1 min y pos-PCR a 60°C por 1 minuto. Algunos de los análisis de la fase de estandarización fueron realizados sin la inclusión de los pasos de pre-PCR y pos-PCR en el perfil térmico utilizado en la qPCR. El valor de Ct obtenido con la qPCR estandarizada para las muestras positivas osciló entre 20 y 29. El valor de Ct para SF1 fue de 23, el valor de Ct para SF2, SF3 y SF4 osciló entre 26 y 29. De esta manera se establecieron como muestras positivas las que presentaron un valor de Ct menor o igual a 29,99, como indeterminadas las que presentaron un Ct entre 30,99 y 34,99 y como negativas aquellas que presentaron un Ct mayor o igual a 35.

La concentración de ADN obtenida a partir de una larva de *S. stercoralis* fue de 0,9 ng/μl, de dos larvas fue de 1,2 ng/μl y de cuatro larvas de 2,6 ng/μl. En el análisis de sensibilidad analítica estimado para la qPCR fue posible detectar con certeza la positividad de la muestra hasta la concentración mínima de 0,9 ng/μl de ADN genómico, estableciéndose este dato como el límite de detección de esta prueba (Tabla 4). Esto basado en los puntos de corte establecidos previamente para el valor del Ct, considerando los resultados obtenidos con los controles positivos evaluados durante la estandarización de la prueba.

En el análisis de especificidad analítica de la qPCR se detectó un valor Ct de >35 para todas las muestras probadas que contenían ADN de otros parásitos intestinales diferentes a *S. stercoralis*: *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, Uncinarias (*Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus*), *H. nana*, *E. histolytica*/*E. dispar*, *E. hartmanni*, *G. intestinalis* e *I. bütschli*, lo que sugiere que no existe reacción cruzada con ninguno de estos parásitos (Tabla 5).

#### **1.4 Determinación de la reproducibilidad de la qPCR**

En la evaluación de la curva estándar analizada mediante qPCR a partir de diluciones seriadas en base 10 partiendo de una concentración de ADN genómico de 24,8 ng/μL hasta  $2,48 \times 10^{-15}$  ng/μL se detectó una eficiencia de -77,5 y un coeficiente de correlación de 0,83 (coeficiente de determinación ajustado 0,79; IC 95% 0,242-0,767) (Figura 3).

En cuanto a la reproducibilidad, se observó que la qPCR estandarizada fue reproducible al utilizar estas mismas concentraciones de ADN, tanto al analizar simultáneamente 3 reacciones de PCR (reproducibilidad intra-ensayo) como en 3 días diferentes (reproducibilidad inter-ensayo). Independientemente del día y del ensayo, el valor de Ct obtenido siempre osciló entre 20 y 29,8, para todas las concentraciones probadas (Figura 4). Para esta comparación se obtuvo un coeficiente de correlación intraclase de 0,882 (IC 95% 0,478-0,973).

## **2 COMPARACIÓN DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CUATRO MÉTODOS CONVENCIONALES DE DIAGNÓSTICO DE LA ESTRONGILOIDIASIS Y DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *S. stercoralis***

### **2.1 Caracterización de la población del estudio**

Para el estudio de concordancia inter-observador se analizaron 44 muestras de materia fecal, el índice Kappa osciló entre 0,29-1,0, siendo los valores cercanos a 1 interpretados como excelente correlación. La reproducibilidad inter-observador se clasificó con un grado excelente para la mayoría de especies de protozoos intestinales (*Entamoeba histolytica*/*E. dispar*, *Entamoeba hatmanni*, *Entamoeba coli*, *Giardia intestinalis*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschli*, *Chilomastix mesnili*) y de patógenos en general, tanto para protozoos como para helmintos. Sin embargo, para las especies de helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus* y *Trichiuris trichiura*) el kappa, obtenido fue de 0,3 (Tabla 6).

Se recolectó un total de 129 muestras de materia fecal en dos grupos de participantes, para evaluar la validez diagnóstica de la qPCR. En la zona rural del Chocó, la recolección de la muestra de materia fecal se llevó a cabo en la totalidad de personas adultas que habitaban en los resguardos de las comunidades indígenas Emberá Chamí, Emberá Dobida y en las veredas del Carmen de Atrato, El consuelo y Quebrada bonita, quienes aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Así mismo, en los barrios periféricos de Quibdó y Medellín, la muestra de heces fue colectada a los adultos que de forma voluntaria quisieron participar en este estudio. En total 72 de las muestras de materia fecal fueron recolectadas en la zona rural del Chocó y 57 en las zonas periurbanas del municipio de Quibdó y de Medellín.

Los participantes del estudio fueron en total 46 hombres y 83 mujeres, con edades comprendidas entre los 18 y 84 años, todos los individuos vivían en una zona de estrato socioeconómico de nivel 1. En relación al nivel de educación se encontró que el 38,8% de la población no tenía ningún nivel de educación, un 38% realizó estudios de básica primaria, 18,6% realizó básica secundaria y el 1,6% realizó estudios técnicos o universitarios. El 90,7% de los individuos pertenecían al régimen subsidiado.

En cuanto a las condiciones higiénico-sanitarias o de la vivienda, 86 personas convivían con animales (67%), 21 (16%) contaban con agua potable y cerca de la vivienda de 40 (31%) de los participantes pasaban aguas residuales. Más de la mitad de los participantes 72 personas (56%) presentaron episodios de diarrea frecuentemente y 84 personas (65%) acostumbraban a caminar o trabajar

descalzo. El total de personas separadas por grupo de muestreo se presenta en la tabla 7.

## **2.2 Resultados de los métodos parasitológicos tradicionales**

Los resultados de las 129 muestras procesadas mediante los métodos parasitológicos tradicionales, arrojaron una frecuencia de parásitos intestinales de 87,98%; distribuidos como se esquematiza en la figura 5.

Mediante la técnica de concentración de Ritchie modificado se detectaron cuatro de las cuatro muestras positivas para *S. stercoralis*, tres de la zona rural del departamento del Chocó y una del barrio La Cruz, en Medellín. Los otros métodos tradicionales específicos para diagnóstico de estrongiloidiasis, arrojaron resultados negativos para todas las muestras, con excepción del aislamiento en placa de agar, que fue capaz de detectar una de cuatro muestras positivas detectadas por el método de Ritchie modificado, arrojando una sensibilidad y especificidad de 25%; (IC= 4,6%-69,9%) y 100% ;(IC=97%-100%) respectivamente, la muestra concordante entre ambos métodos era proveniente del barrio La Cruz. Los resultados parasitológicos, discriminados por grupo y por método de detección se presentan en la tabla 8.

## **2.3 Resultados de la qPCR para diagnóstico de *S. stercoralis***

De las 129 muestras procesadas mediante qPCR, un total de 29 muestras arrojaron resultados positivos ( $Ct < 29,99$ ). De estas, 3 presentaron concordancia con los métodos convencionales de diagnóstico parasitológico, una de las

muestras provenía del barrio La cruz, en la zona periurbana de Medellín y las otras dos eran de la zona rural del Chocó. De los 26 resultados positivos restantes, 2 pertenecían a muestras provenientes de la zona rural del Chocó y 24 al barrio la Cruz de Medellín. 18 muestras procedentes del Chocó y 6 de la zona periurbana de Medellín fueron clasificadas como indeterminadas y 76 muestras arrojaron resultados negativos (Tabla 9).

En cuanto al análisis del efecto de la concentración de ADN en el rendimiento de la qPCR, se evidenció que efectivamente la concentración del ADN genómico condiciona la obtención de valores de Ct altos para muestras con bajas concentraciones de ADN del parásito, y viceversa. El resultado de la qPCR para la muestra con valor de Ct de 28, continuó siendo positivo con un valor de Ct de 28,73 y 28,12 en las reacciones donde la concentración de ADN genómico de muestras fue de 15 y 30 ng/μl, respectivamente. Para las concentraciones de 60, 90 y 120 ng/μl el valor de Ct aumentó a valores de 30, 34,15 y 40, respectivamente. En la muestra con valor de Ct de 29, el valor de Ct siguió siendo positivo, con un valor de 29,40 y 29,71 en las reacciones donde la concentración de ADN genómico de muestras fue de 6 y 12 ng/μl, respectivamente. Para las concentraciones de 24 y 36 ng/μl el valor de Ct aumentó a valores de 33,87 y 35,76 respectivamente, en concentraciones mayores o iguales a 48 ng/μl el Ct obtenido fue de 40. En cuanto a la valoración de la presencia de inhibidores de la amplificación del ADN, mediante el análisis de muestras diluidas de manera seriada en base 10, no se observaron cambios con relación al valor de Ct obtenido inicialmente en ninguna de las concentraciones evaluadas.

## **2.4 Análisis de filogenia basado en secuencias parciales del gen 18S de la subunidad pequeña de ARN ribosomal**

El análisis de las secuencias obtenidas para el fragmento de 101 pb del marcador molecular 18S ARNr de la muestra I9 y del control positivo SF3 amplificadas mediante qPCR mostro un porcentaje de identidad de 95% y 96% respectivamente, en comparación con la secuencia parcial del mismo marcador reportada para *S. stercoralis* en el GenBank con código de acceso M89229 (tamaño analizado de 50 pb). Mientras que en el análisis BLASTn de las secuenciadas obtenidas para el fragmento de 244 pb del 18S ARNr se obtuvo un porcentaje de identidad entre 99% y 100% con la secuencia parcial de esta misma región reportada para *S. stercoralis* en el GenBank con código de acceso KM387397. En cuanto a los análisis de filogenia basados en este marcador molecular (tamaño analizado de 101pb), tanto el dendograma obtenido mediante el análisis de máxima verosimilitud (Figura 6) como el de Inferencia Bayesiana (Figura 7), muestran bajo un solo grupo a todas las secuencias obtenidas en este estudio, que habían sido clasificadas como positivas o indeterminadas en el análisis de PCR en tiempo real. Dichas secuencias forman una politomía junto con todas las secuencias del género *Strongyloides* reportadas en el GenBank e incluidas en dicho análisis. Claramente las secuencias de *N. americanus*, *A. duodelale* y *A. lumbricoides* se ubican por fuera del grupo de secuencias pertenecientes al género *Strongyloides*.

## 2.5 Evaluación diagnóstica de la qPCR

La PCR en tiempo real, estandarizada y evaluada para diagnóstico de *S. stercoralis*, presentó una sensibilidad de 75% (20,07%-100%), especificidad de 79,2% (71,68%-86,72%), valor predictivo positivo de 10,34% (0,0%-23,15%) y valor predictivo negativo de 99,0% (99,55%-100%). Los demás parámetros calculados para la qPCR se presentan en la tabla 10. En cuanto a la concordancia observada, el índice Kappa estimado entre la qPCR y los métodos fue de 0,14 (IC95%=-0,016-0,30).

## DISCUSIÓN

La qPCR estandarizada y evaluada para la detección de *S. stercoralis* utilizando como prueba de referencia un conjunto de métodos de diagnóstico tradicional (examen directo de heces, técnica de Ritchie modificado, cultivo en placa de agar y el método de Harada-Mori) presentó un desempeño, eficiencia y rendimiento bajo.

En cuanto a los valores de sensibilidad y especificidad observados para la qPCR en este estudio, estos fueron inferiores a los reportados en investigaciones previas, los cuales varían entre 88,9% a 100% y 94,8% a 100% (25, 27, 29, 51). Sin embargo, cabe resaltar que los estudios que han reportado una sensibilidad de 100% para la PCR, han evaluado esta técnica solamente en muestras provenientes de personas con sintomatología gastrointestinal, con cargas parasitarias altas, tanto para *S. stercoralis* como para otros patógenos (25, 27, 51),

lo que sugiere que los resultados obtenidos en dichos estudios no podrían ser extrapolados a población general, ni podrían ser comparables con los datos obtenidos en el presente trabajo.

Respecto a las demás características operativas de la qPCR evaluadas, la seguridad diagnóstica expresada en los valores predictivos obtenidos sugieren que la prueba de qPCR tiene una excelente capacidad para detectar a las personas que no tienen estrongiloidiasis; no obstante, presenta dificultades en la detección de verdaderos positivos.

Algunos estudios han reportado buena correlación entre los métodos moleculares, como la PCR, con los métodos parasitológicos usados tradicionalmente para detección de *S. stercoralis*, más exactamente con el cultivo en placa de agar (17, 34). Sin embargo, en este estudio se observó que la concordancia entre la qPCR y los métodos convencionales evaluados fue baja, coincidiendo solo en el diagnóstico de tres de los cuatro resultados positivos identificados con las técnicas parasitológicas tradicionales. Este hallazgo es similar a lo reportado por Schar, *et al.*, (29), quienes encontraron que la PCR identificó un número menor de muestras (38/218) de las que habían sido clasificadas como positivas usando conjuntamente el método de Baermann y el cultivo en placa de agar (41/218).

Existen diversos factores que pueden explicar la ocurrencia de resultados falsos negativos en la qPCR, entre los que se encuentran la preservación, el almacenamiento y la presencia de inhibidores en las muestras de materia fecal

(52). En este sentido, las condiciones de transporte de las muestras procedentes del departamento del Chocó pudieron haber afectado la calidad del ADN y favorecer la acción de endonucleasas con un efecto degradador sobre el material genético presente, impidiendo el desarrollo exitoso de la prueba de qPCR específicamente en dichas muestra (53). En investigaciones realizadas por Nsubuga, *et al.*, (54), analizando heces de simios, se demostró que la temperatura de recolección y almacenamiento de la muestra de materia fecal juega un papel importante en la recuperación del ADN, siendo menor la cantidad de ADN genómico extraído a partir de muestras que fueron recolectadas y almacenadas durante épocas del año con temperaturas cálidas (55, 56).

Asimismo, al realizar los ensayos de reproducibilidad se observó la falta de linealidad en los datos obtenidos en la curva estándar de la qPCR, lo que sugiere que pudo haber presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras de materia fecal analizadas. Este tipo de muestra biológica es una matriz compleja, cuya presencia de inhibidores de la amplificación puede estar asociada incluso con la dieta del individuo, tal y como lo demostró Monteiro, *et al.*, (57), en un estudio donde caracterizaron la presencia de inhibidores endógenos de la PCR, encontrando que múltiples polisacáridos derivados de la dieta se convierten en potentes inhibidores de la amplificación.

En estudios adicionales, en los cuales han valorado varios protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de materia fecal, en función del rendimiento y la eficiencia de la PCR (58-60), han sugerido que el tratamiento de

las muestras con métodos físicos como la sonicación o la incubación a temperaturas entre 50°C y 100°C, empleando enzimas como la proteinasa K mejoran la eficiencia y rendimiento de la técnica. Aunque en el presente estudio, se emplearon algunos de los tratamientos sugeridos en dichas investigaciones; será necesario enfocar esfuerzos técnicos adicionales para optimizar aún más los procedimientos de extracción de ADN genómico a partir de muestras de materia fecal, con el fin de mejorar el desempeño y la eficiencia de la qPCR evaluada.

En el presente estudio se observó como para el control positivo procedente de un paciente con hiperinfección se obtuvo un valor de Ct bajo (Ct=23), mientras, que para los demás controles positivos procedentes de pacientes con cargas parasitarias altas el valor de Ct estaba aumentado. En concordancia, Schar, *et al.*, (29) observó un aumento en el valor de Ct obtenido de muestras con cargas parasitarias bajas, sin embargo, estudios futuros deberán evaluar la correlación entre el valor de Ct obtenido y la intensidad de la infección por *S. stercoralis* para establecer la relación existente entre la carga parasitaria y la eficiencia de la amplificación mediante qPCR.

Mediante la utilización de la qPCR se encontró un número mayor de muestras positivas para *S. stercoralis* que las identificadas por los métodos convencionales de diagnóstico parasitológico, estos hallazgos son similares a los reportados por Moghaddassani, *et al.*, (25), quienes detectaron cinco muestras mediante PCR que no fueron identificadas por el método de referencia (Cultivo en placa de agar, examen directo de heces y método de concentración de Ritchie), sugiriendo que la

PCR fue más eficiente que los métodos convencionales para diagnosticar la estrongiloidiasis en personas con baja carga parasitaria. Es de resaltar que los cebadores y la sonda empleados para la amplificación del gen 18S del ARN ribosomal de *S. stercoralis* en la qPCR evaluada mostraron alta especificidad de especie, tanto en los análisis de verificación realizados *in silico*, como mediante el análisis de las secuencias de ADN obtenidas a partir de los productos de amplificación de los controles positivos y de las muestras secuenciadas. Aunque en los análisis de filogenia realizados en este estudio, no pudieron ser resueltas las relaciones entre los especímenes analizados del género *Strongyloides* y los obtenidos en la presente investigación, la topología de los arboles sugiere una relación estrecha entre los parásitos provenientes del Chocó y Medellín con respecto a los reportados en el GenBank. Para propósitos de la presente investigación estos resultados indican la especificidad del método de qPCR, incluso indica que las muestras que están siendo clasificadas actualmente como indeterminadas, por presentar un valor de Ct entre 30,99 y 34,99 están claramente relacionadas con *Strongyloides* spp. y la carga parasitaria que poseen es muy baja. En este sentido, sería recomendable la estandarización de un protocolo de concentración de las formas parasitarias como un paso previo a la extracción del ADN genómico, para mejorar la concentración del ADN extraído y la eficiencia y linealidad de la qPCR.

De manera concurrente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en un estudio realizado por Schar, *et al.*, (29), demostraron que la concentración de ADN del parásito presente en la muestra juega un papel importante a la hora de

clasificar acertadamente a un individuo como negativo o positivo para la infección por *S. stercoralis*, así como también influye la etapa de la infección en la que se encuentre el individuo, y que esto puede afectar directamente el rendimiento de la qPCR, aumentando el valor de Ct ante bajas concentraciones de ADN extraídas de la muestra. Otro aspecto importante a resaltar de este estudio y del realizado por Basuni, *et al.*, (26), es el establecimiento de rangos en el valor de Ct para clasificar una muestra como positiva o negativa, considerando las dificultades que pueden presentarse en la obtención de altas concentraciones de ADN en los casos de infecciones con baja carga parasitaria.

En este sentido, es posible que las muestras que resultaron positivas para *S. stercoralis* (detectadas sólo por qPCR) pertenecieran a pacientes con una parasitosis crónica, caracterizada por la intermitencia en la excreción de las larvas, con fluctuaciones en la carga parasitaria y con el requerimiento del análisis de múltiples muestras para detectarlo mediante las pruebas tradicionales, demostrándose precisamente la ventaja que presenta la qPCR en la detección de cargas parasitarias bajas. Esto se sugiere debido a que en su mayoría estos resultados pertenecían a personas residentes por más de cinco años en el barrio La cruz y Versailles número II, pero que procedían de los departamentos de Chocó y del Urabá antioqueño.

Adicionalmente, es importante considerar que algunos de los métodos empleados como prueba de referencia en este estudio, como el Cultivo en placa de agar y Harada-Mori dependen de la viabilidad de las larvas para la detección del parásito,

y en el caso de la qPCR este aspecto no es indispensable para la detección específica de este nemátodo (14, 61-64). En el método de Baermann, también se requiere de la viabilidad del parásito para obtener resultados positivos, y aunque demostró tener alta sensibilidad para el diagnóstico de *S. stercoralis* (20), no se empleó como prueba de referencia en este estudio debido a que requiere grandes cantidades de materia fecal (20g de heces) para su procesamiento, lo que resulta difícil para la fase de recolección de la muestra (65), y para su procesamiento en un laboratorio clínico

En cuanto al examen directo de heces, se ha demostrado que presenta baja sensibilidad para el diagnóstico de estrongiloidiasis (20), no obstante, algunos estudios sugieren que esta sensibilidad puede mejorar notablemente con la evaluación seriada de entre 5 y 7 muestras de materia fecal (66). Así mismo, el bajo valor de índice *kappa* obtenido en este trabajo, demuestra una pobre concordancia entre el examen directo de heces y el método de Ritchie modificado para la detección de helmintos intestinales. La literatura sugiere que alteraciones en los valores de concordancia entre los métodos pueden ser debidas a: i) variabilidad entre observadores, ii) variabilidad proporcionada por el instrumento de medida y iii) la variabilidad causada por medir en momentos diferentes en el tiempo (42), aunado a lo anterior, se encuentra la baja excreción parasitaria en casos de infección leve con helmintos (4). No obstante, el hecho de que las muestras fueran analizadas por dos observadores de manera ciega e independiente en este estudio, y que la forma parasitaria fuera reportada por al

menos uno de los dos analistas mediante cualquiera de los métodos, genera mayor confiabilidad en los resultados obtenidos en los métodos convencionales.

Debido a lo anterior, cabe resaltar que los cuatro métodos tradicionales de diagnóstico parasitológico con los que se comparó la qPCR en esta investigación, no alcanzan a ser considerados como un *Gold standard*, debido a que ninguno de ellos por separado tiene una sensibilidad o especificidad cercana al 100%, lo que puede subestimar la presencia del parásito y generar una categorización errónea en los resultados. Bajo estas mismas circunstancias, algunos investigadores han ejecutado análisis bayesianos para la estimación de la prevalencia de *S. stercoralis* y evaluar las características operativas de métodos para la detección de este nemátodo en ausencia de un *Gold standard*, sugiriendo que de esta manera no se ven afectados parámetros como la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de las pruebas evaluadas (67, 68). Por ello, en futuros análisis de estos datos se considerará la utilización de este tipo de aproximación estadística para la evaluación de esta qPCR para diagnóstico de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal, donde factores como la cronicidad de la infección, la intermitencia en la expulsión de las larvas, la baja carga parasitaria y la falta de una prueba de referencia idónea, pueden estar influyendo en los resultados obtenidos en las pruebas evaluadas.

Por último, un estudio realizado por Pakdee *et al.*, (69) basado en el análisis de secuencias obtenidas para el gen 18S del ARN ribosomal reportó que poblaciones de *S. stercoralis* de diferentes zonas geográficas (Tailandia y Japón) presentaron

divergencia genética entre ellas. En Colombia, aún no se ha evaluado si existe diferenciación genética entre poblaciones de *S. stercoralis* a lo largo de su distribución en el país, por lo tanto sería pertinente la realización de un análisis de este tipo, que permita la descripción de la estructura genética de las poblaciones circulantes de este parásito, pues esto podría estar influyendo en las características operativas de la qPCR evaluada en este estudio.

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este estudio se observó que la qPCR evaluada tiene una sensibilidad similar a la de los métodos convencionales de diagnóstico de la estrombiloidiasis, aunque tiene la ventaja de detectar de manera específica bajas concentraciones de ADN de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal, sobre todo en las fases crónicas de la infección, favoreciendo la instauración de una terapia de desparasitación efectiva principalmente en pacientes con falla de la respuesta inmune de tipo celular, quienes presentan mayor riesgo de desarrollo de complicaciones fatales como el síndrome de hiperinfección y diseminación del parásito. Sin embargo, se debe lograr una mayor optimización de la técnica de extracción de ADN para la eliminación de inhibidores de la amplificación presentes en las muestras de materia fecal, además se debe mejorar la linealidad de la qPCR para que pueda ser aplicada como método de diagnóstico y cuantificación de *S. stercoralis*. Otro aspecto importante a evaluar debe ser la ejecución de un método de concentración de las formas parasitarias de manera previa a la extracción del ADN genómico, que permita aumentar la probabilidad de detección del parásito en los casos de infecciones crónicas con cargas parasitarias bajas (70). Por último,

después de optimizar las condiciones técnicas mencionadas anteriormente, se deberá continuar con el proceso de validación de la qPCR como método diagnóstico de la estrongiloidiasis realizando dicho análisis con un mayor tamaño de muestra en los diferentes grupos evaluados. Es de resaltar que actualmente este estudio también se está desarrollando en un grupo de personas que se encuentran en tratamiento inmunosupresor con dosis inferiores a 700mg de prednisolona, hasta la fecha se han recolectado y procesado mediante los métodos convencionales de diagnóstico parasitológico 17 muestras de materia fecal y se continúa en proceso de captación de participantes, esto con el fin de evaluar el comportamiento de la prueba en diferentes contextos epidemiológicos y clínicos que puedan dar mayor cuenta de la utilidad de la prueba.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por acompañarme siempre, a mi tutora, por guiarme, por su paciencia, dirección y apoyo, a los miembros del comité tutorial por las enseñanzas, a mi familia por el apoyo incondicional, colaboración e inspiración, a Sofía, a mis amigos de siempre y compañeros de grupo.

Al grupo PIRAGUAS de la Universidad Pontificia Bolivariana por el apoyo prestado en las salidas de campo al departamento del Chocó y la recolección de muestras de materia fecal. A la fundación madre Teresa de Calcuta liderada por el padre Miguel Pérez y a las personas del barrio La cruz por su valiosa colaboración en la recolección de las muestras.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por Centro de Investigación para el Desarrollo y la Innovación – CIDI de la Universidad Pontificia Bolivariana, mediante los proyectos con número de radicado 175-11/11 935A y 252B-08/14-44.

## Bibliografía

1. Profamilia. Encuesta Nacional de demografía y salud ENDS 2010 2010.
2. Jorge B, A ZN. Nemátodos intestinales de importancia médica en Colombia: ¿un problema un resuelto? : Iatreia; 2011. p. 47-56.
3. Schar F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. Strongyloides stercoralis: Global Distribution and Risk Factors. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(7):e2288.
4. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. Quinta ed. Medellín, Colombia 2012. 735 p.
5. Kozubsky L, Archelli S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de Strongyloides stercoralis. Acta bioquím clin latinoam 38(3):333-8.
6. SIAC. SISTEMA DE INFORMACIÓN AMBIENTAL DE COLOMBIA Colombia 2011[cited 2015 [https://www.siac.gov.co/categoria/Subportal\\_Suelo\\_Subsuelo.aspx](https://www.siac.gov.co/categoria/Subportal_Suelo_Subsuelo.aspx)].
7. Sánchez JA, Madriñán S. ECOSISTEMAS TERRESTRES DE COLOMBIA Y EL MUNDO. Biodiversidad, conservación y desarrollo. Primera ed. Bogotá: Universidad de los Andes; 2012. 112 p.
8. Thewartha GT. Los climas de las tierras del pacífico colombiano 1975; 29:[8 p.]. [cited 2015 [http://www.sogeocol.edu.co/documentos/los\\_cli\\_tie\\_pac.pdf](http://www.sogeocol.edu.co/documentos/los_cli_tie_pac.pdf)]
9. Medina Lozano A, García Montoya G, Galván Díaz AL, Botero Garcés J. Prevalencia de parásitos intestinales en niños que asisten al Templo Comedor Sagrado Corazón Teresa Benedicta de la Cruz, del barrio Vallejuelos, Medellín, 2007. IATREIA; 2009. p. 227-34.
10. Cardona Arias JA, Bedoya Urrego K. Frecuencia de parásitos intestinales y evaluación de métodos para su diagnóstico en una comunidad marginal de Medellín, Colombia. Iatreia. 2013;26(3):257-68.

11. Torres D, Álzate A, Mejía G, Trujillo J, Hernández JM. Prevalencia de parasitosis intestinal en niños escolares de Quibdó, Chocó, y evaluación de la tasa de reinfección a los 3 y 6 meses después del tratamiento. 2011;31.
12. Becerril MA. Parasitología médica. Tercera ed. México2011. 401 p.
13. Montes M, Sawhney C, Barros N. Strongyloides stercoralis: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(5):500-4.
14. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):1040-7.
15. Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal UC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(3):242-6.
16. Al Maslamani MA, Al Soub HA, Al Khal AL, Al Bozom IA, Abu Khattab MJ, Chacko KC. Strongyloides stercoralis hyperinfection after corticosteroid therapy: a report of two cases. *Ann Saudi Med.* 2009;29(5):397-401.
17. Altintop L, Cakar B, Hokelek M, Bektas A, Yildiz L, Karaoglanoglu M. Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis and bronchial asthma: A case report. *Ann of Clin Microb and Antimicrobials.* 2010;9.
18. Issa H, Aljama MA, Al-Salem AH. Strongyloides stercoralis hyperinfection in a post-renal transplant patient. *Clin and Experimental Gastroenterology.* 2011;4(1):269-71.
19. Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin Mol Allergy.* 2006;4:8.
20. Campo P L, Gutiérrez LA, Cardona A J. Infección por Strongyloides stercoralis: Metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). *Rev Esp Salud pública;* 2014. p. 581-600.
21. Sudré AP, Macedo HWD, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev patol trop.*35(3):173-84.
22. Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, et al. Increased detection rate of Strongyloides stercoralis by repeated stool examinations using the agar plate culture method. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(4):683-4.
23. Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RC, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology.* 2014;141(5):716-21.

24. Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EA, Polderman AM, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(4):342-6.
25. Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni M, Mowlavi G, Kia E. Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples. *Iran J Parasitol.* 2011;6(2):23-30.
26. Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):338-43.
27. Janwan P, Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Anamnart W, Maleewong W. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* and *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples using a duplex real-time PCR and melting curve analysis. *Parasitol Res.* 2011;109(6):1593-601.
28. Sultana Y, Jeffreys N, Watts MR, Gilbert GL, Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1048-51.
29. Schar F, Odermatt P, Khieu V, Panning M, Duong S, Muth S, et al. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Trop.* 2013;126(2):89-92.
30. Khieu V, Schar F, Marti H, Sayasone S, Duong S, Muth S, et al. Diagnosis, treatment and risk factors of *Strongyloides stercoralis* in schoolchildren in Cambodia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2035.
31. Wong SS, Fung KS, Chau S, Poon RW, Wong SC, Yuen KY. Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why? *Exp Biol Med (Maywood).* 2014.
32. Cerda J, Cifuentes L. Uso de tests diagnósticos en la práctica clínica (Parte 1): Análisis de las propiedades de un test diagnóstico. *Rev chil infectol [Internet].* 2010; 27(3):[205-8 pp.].
33. Escrig-Sos J, Martínez-Ramos D, Manuel Miralles-Tena J. Pruebas diagnósticas: nociones básicas para su correcta interpretación y uso. *Cir Esp.* 2006;79(5):267-73.
34. Gutiérrez C, Ramos J. Evaluación de la validez de pruebas diagnósticas. *CIMEL [Internet].* 2005; 10(1):[65-72 pp.].
35. Sociedad española de química clínica. Evaluación de Pruebas diagnósticas:[26 p.]. cited 2015 [http:// www.seqc.es/dl.asp?](http://www.seqc.es/dl.asp?)

36. Cifuentes L, Cerda J. Uso de tests diagnósticos en la práctica clínica (Parte 2): Aplicación clínica y utilidad de un test diagnóstico. Rev chil infectol [Internet]. 2010; 27(4):[316-9 pp.].
37. Kramme S, Nissen N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer B, et al. Novel real-time PCR for the universal detection of Strongyloides species. J Med Microbiol. 2011;60(4):454-8.
38. Cerda Jaime VL. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Rev Chil Pediatr. 2008;79 (1):54-8.
39. Édgar CR, A RRJ, Hernando GD. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Rev. Colomb. Obstet. Ginecol; 2010. p. 247-55.
40. Corp I. IBM SPSS Statistics for Windows. Version 21. Armonk, NY: IBM Corp; 2012.
41. (OPS-OMS) OPdIS. Epidat: datos epidemiológicos de software de análisis. Versión 3.1 . <http://dxsp.sergas.es>; 2004.
42. Cortés Reyes É, Rubio Romero JA, Gaitán Duarte H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Rev. Colomb. Obstet. Ginecol; 2010. p. 247-55.
43. Marchi Blatt J, Cantos GA. Evaluation of techniques for the diagnosis of Strongyloides stercoralis in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individuals in the city of Itajai, Brazil. Braz J Infect Dis. 2003;7(6):402-8.
44. Jongwutiwes S, Charoenkorn M, Sitthichareonchai P, Akaraborvorn P, Putaporntip C. Increased sensitivity of routine laboratory detection of Strongyloides stercoralis and hookworm by agar-plate culture. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(4):398-400.
45. Marcos R LA, Canales M, Terashima A. Métodos de diagnóstico para *Strongyloides stercoralis* en el Perú 2010; 18:[8 p.].
46. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, et al. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28:1647–1649.
47. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. versión 6. 2013.
48. Schar F, Guo L, Streit A, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. Strongyloides stercoralis genotypes in humans in Cambodia. Parasitol Int. 2014;63(3):533-6.

49. Putland RA, Thomas SM, Grove DI, Johnson AM. Analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Strongyloides stercoralis*. *Int J Parasitol*. 1993;23(1):149-51.
50. Dorris M, Blaxter M. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides stercoralis*. *Int J Parasitol*. 2000;30(8):939-41.
51. Rayan Z Hanan, Solimán Rasha H, M GN. Detection of *Strongyloides stercoralis* in Fecal Samples Using Conventional Parasitological Techniques and Real-Time PCR: A Comparative Study. Egypt: PUJ; 2012.
52. Ramos F, Zurabian R, Moran P, Ramiro M, Gomez A, Clark CG, et al. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(3):335-6.
53. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. 2001;2(5):353-9.
54. Nsubuga AM, Robbins MM, Roeder AD, Morin PA, Boesch C, Vigilant L. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol Ecol*. 2004;13(7):2089-94.
55. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods*. 2009;78(3):292-6.
56. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 2012;12:158.
57. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol*. 1997;35(4):995-8.
58. Demeler J, Ramunke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu JB, et al. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS One*. 2013;8(4):e61285.
59. Adamska M, Leonska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. *Parasite*. 2010;17(4):299-305.
60. Nunes CM, Lima LG, Manoel CS, Pereira RN, Nakano MM, Garcia JF. Fecal specimens preparation methods for PCR diagnosis of human taeniosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(1):45-7.

61. Sing A, Leitritz L, Bogner JR, Heesemann J. First-glance diagnosis of *Strongyloides stercoralis* autoinfection by stool microscopy. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1610-1.
62. Shield JM, Page W. Effective diagnostic tests and anthelmintic treatment for *Strongyloides stercoralis* make community control feasible. *P N G Med J.* 2008;51(3-4):105-19.
63. Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(6):967-73.
64. Gill GV, Welch E, Bailey JW, Bell DR, Beeching NJ. Chronic *Strongyloides stercoralis* infection in former British Far East prisoners of war. *Qjm.* 2004;97(12):789-95.
65. Carrada-Bravo T. *Strongyloides stercoralis*: *Ciclo vital, cuadros clínicos, epidemiología, patología y terapéutica*. México: Rev Mex Patol Clin; 2008. p. 88-110.
66. Nielsen PB, Mojon M. Improved diagnosis of *strongyloides stercoralis* by seven consecutive stool specimens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1987;263(4):616-8.
67. Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 1995;141(3):263-72.
68. Dendukuri N, Joseph L. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics.* 2001;57(1):158-67.
69. Pakdee W, Thaenkham U, Dekumyoy P, Sa-Nguankiat S, Maipanich W, Pubampen S. Genetic differentiation of *strongyloides stercoralis* from two different climate zones revealed by 18S ribosomal DNA sequence comparison. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012;43(6):1333-8.
70. Asher AJ, Waldron LS, Power ML. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. *Parasitol Res.* 2012;110(2):853-8.

**Tabla 1.** Representación de la posición de los cebadores usados en este estudio para amplificar segmentos parciales del gen 18S de la subunidad pequeña de ARN ribosomal de *S. stercoralis*.

Tamaño del producto de amplificación	Secuencias de los cebadores	Posición en la secuencia completa del gen 18S ARNr	Referencias
101 pb	F: GAATCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC R: TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC	1548->1575 1626<-1648	Basuni M, et al., 2011; Verweij JJ, et al., 2009
244 pb	F: ACCGTAAACTATGCCTACTAGA R: AACCACTAAATCATGAAAGAGCTA	990->1011 1209<-1232	Janwan P, et al., 2011;
Sonda	ACACACCGGCCGTCGCTGC	1604->1622	Basuni M, et al., 2011; Verweij JJ, et al., 2009

>M84229.1|S stercoralis 18s ribosomal rna complete

acctgggtgatcctgccagtagtcatatgcttgtctcaagattaagccatgcatgtctaagtataaacaattcactactgtgaaac  
 tgcgaatggctcattaaatcagttatagtttatttgatgggttcttgctacatggataactgtggtaattctagagctaatacatgc  
 tkaaaagccccgacttctggaaggggtgtatttattagataaaaaaccaatgacttcgggctccttgggtgattcataataacttctc  
 gaatcgcatggccttgccggcgatgcttcattcaaatttctgcccctatcaacttctcgatggtaggatagtgccctaccatggat  
 caacgggtaacggggaattaggggttcgatccggagagggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaagcagcaggcgcgaaa  
 attacccaattttagttaaaagaggttagtgacgaaaaatgacaaccaaataattattattaatatttggattgaaaatcttcaagttt  
 aaatmaccttgttggtaaaaggaagggcaagtctggtgccagcagccggttaataaccagcttccaagtcataaaaatgattgttg  
 tggttaaaaagctcgtagttggattataaagattgtataatgagcatcttggatgttatttaatacattatcatcttataattttatt  
 atattagaaaaataataaactgtcactttgaataaatcagaggggttaaaccagacattatattgtttgtaggtctagcatggaa  
 taacactatagaaaaatttagtgggttccacttaatttttcatgattaataggaacaaacggggcattcgtatcgctacgttaga  
 ggtgaaatcttggaccgtagcgagacgtcctactgcaagcatttgcagaatgtttccattaatcaagaacgaaaggttagagg  
 ttcgaagcgatcagataaccgccctagtcttaACCGTAAACTATGCCTACTAGAtgtatgaattattagttataaattttatgcat  
 ctctcggaaacgaaagtcttccggttccgggggaagtatgggtgaaaagctgaaacttaaggaattgacggaaggcaccaccagg  
 agtggagcctgcggttaattttagctcaacacgggaaactcaccgggcccggacactataaggattgacagattgaTAGCTCTTTC  
 ATGATTTAGTGGTTgggtggtgcatggccgttcttagttcgtggatagatttgtctgggtgatccgataacgagcggagactttat  
 gttatattaataataaatttttggtttatttataataataataatatttataaacagattaatagtggttaactatttgagag  
 agagcgataacaggtctgtgatgcccttagatgtccggggctgcacgcgctacaatgtagtgatcattatgttccgttttagaga  
 taaatgggtaaacattgaaaacattacgtaactgggagtgaaaattgcaattatttttcatgaaacgagGAATCCAAGTAAACGTAA  
 GTCATTAGCttacattgattacgtccctgccccttgtacacaccgcccgtcgctgcccGAACTGAGCAATATCCAGAGGCAggaag  
 agatgtaataaatttttaatttttttataataatccttccaatcgctgttggttgaaacggggcaaaagtcgtaacaagggttttcg  
 taggtgaacctgcagaaggatcatca

En azul se señalan los cebadores que amplifican un fragmento de 101pb en la qPCR . En rojo los cebadores que amplican un fragmento de 244 pb usado en los analisis de filogenia molecular y en verde la Sonda empleada en la qPCR

**Tabla 2.** Valores de la media y mediana de la concentración y del índice de pureza del ADN expresado en la razón de absorbancia A260/A280, usando el protocolo QIAamp DNA Stool Mini Kit QIAGEN® y QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN® modificado.

Estadístico	DNA Stool Mini Kit QIAGEN®		QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN®	
	Concentración	Índice de pureza	Concentración	Índice de pureza
Media	22,0	2,1	20,4	1,77
Mediana	17	2,4	18	1,8
DE	24,36	0,59	9,4	0,13
Valor p	0,551 <sup>a</sup>		0,028 <sup>b</sup>	

DE: desviación estándar.

Estadístico empleado U de Mann-Whitney.

Valor  $p < 0,05$ ; a). Valor  $p$  para la comparación de la concentración de ADN obtenida por ambos métodos; b). Valor  $p$  obtenido al comparar el índice de pureza (A260/A280) del ADN extraído con cada método.

**Tabla 3.** Reactivos y concentraciones óptimas para la qPCR

<b>Componente</b>	<b>Gradientes de concentración probados</b>	<b>Concentración final</b>
TaqMan® Universal PCR Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA polimerasa, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs, UDG y colorante de referencia interna ROX)	--	1 X
IPC mix 10x	--	1X
IPC DNA 50X	--	1X
Cebador F <sup>1</sup>	60nM-100nM-200nM	200nM
Cebador R <sup>1</sup>	60nM-100nM-200nM	200nM
Sonda Taqman <sup>2</sup>	100nM-250nM-300nM	200nM
BSA	--	0,1mg/μL
DMSO	--	1%
DNA	13ng/μL-50ng/μL-100ng/μL	100ng

IPC: (*Internal positive control*) control positivo interno, se empleó con las concentraciones sugeridas por el fabricante

**Tabla 4.** Sensibilidad analítica de la qPCR empleando 8 diluciones seriadas de DNA de larvas de *S. stercoralis* obtenidas de un cultivo puro.

<b>Concentración de ADN obtenida a partir de 4 larvas</b>	<b>Diluciones seriadas (ng/μl)</b>	<b>Promedio de amplificación (Ct)</b>
260 ng/100μl	0,2	31,23
	0,4	30,67
	0,6	30,41
	0,9	29,93
	2,6	24,61
	6,8	23,92
	10	23,90
	13	23,78

Ct: valores umbral del ciclo de amplificación obtenido para cada una de las concentraciones empleadas

**Tabla 5.** Especificidad analítica de la qPCR analizando muestras de heces que contienen diferentes parásitos intestinales.

Muestra	Parásitos intestinales detectados en examen directo de heces	Con Pre-PCR e IPC		Sin Pre-PCR y sin IPC
		Ct	Ct IPC	Ct
SF1	<i>Strongyloides stercoralis</i>	24	33	26
SF3	<i>Strongyloides stercoralis</i>	28	33	29
CN	Mix+agua ultrapura	35	28	40
CN	Mix+ agua ultrapura	35	28	40
1	<i>Ancylostoma duodenale/Necator americanus</i> y <i>T. trichiura</i> , <i>A. lumbricoides</i>	35	28	38
2	<i>Trichiuris trichiura</i> y <i>A. lumbricoides</i>	35	28	38
3	<i>Ancylostoma duodenale/Necator americanus</i> , <i>T. trichiura</i> y <i>A. lumbricoides</i> , <i>H. nana</i>	35	28	37
4	<i>Ascaris lumbricoides</i>	35	28	37
5	<i>Hymenolepis nana</i>	35	28	40
6	<i>H. nana</i> , <i>T. trichiura</i> y <i>A. lumbricoides</i> , <i>G. intestinalis</i>	35	28	40
7	<i>Hymenolepis nana</i> , <i>A. Lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i>	35	28	40
8	<i>T. trichiura</i>	35	28	37
9	<i>H. nana</i> , <i>T. Trichiura</i> , <i>A. duodenale/N. americanus</i> ,	35	28	40
10	<i>H. nana</i> y <i>T. trichiura</i>	35	28	38
11	<i>Entamoeba histolytica/ E. dispar</i> , <i>E. hatmanni</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. mesnili</i>	35	28	40
12	<i>E. histolytica/ E. dispar</i> , <i>E. hatmanni</i> , <i>E. coli</i>	35	28	38
13	<i>Iodamoeba butschli</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>A. duodenale/N. americanus</i>	35	28	39
14	<i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>E. histolytica/ E. dispar</i> , <i>I. butschli</i> , <i>H. nana</i>	35	28	40
15	<i>A. lumbricoides</i> , <i>G. intestinalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. mesnili</i>	35	28	37
16	<i>A. lumbricoides</i> , <i>H. nana</i> , <i>E. histolytica/ E. dispar</i> , <i>I. butschli</i> , <i>G. intestinalis</i>	35	28	38

Ct: valores umbral del ciclo de amplificación. IPC: control positivo interno de la reacción.

**Tabla 6.** Análisis de reproducibilidad inter-observador del examen directo de heces y el método de Ritchie modificado.

Agentes etiológicos	Examen directo				Concentración			
	Proporción		Kappa	Phi	Proporción		Kappa	Phi
	Uno	Dos			Uno	Dos		
<b>Por grupos</b>								
Protozoos	68,6	68,6	0,818	0,818	68,6	72,5	0,906	0,910
Helmintos	7,8	3,9	0,297	0,317	9,8	2,0	0,311	0,429
Patógenos	5,9	5,9	1,000	1,000	5,9	5,9	1,000	1,000
Comensales	68,6	66,7	0,776	0,777	68,6	70,6	0,861	0,862
<b>Global</b>								
Infección general (+/-)	68,6	68,6	0,818	0,818	68,6	72,5	0,906	0,910
Poliparasitismo (-/1Sp/≥2Sp)	49,0	47,1	0,750	0,952 <sub>r</sub>	54,9	49,0	0,840	1,000 <sub>r</sub>
Una especie	19,6	21,6			13,7	23,5		
Dos especies	17,6	15,7			17,6	17,6		
Tres especies	19,6	23,5	0,673	0,956 <sub>r</sub>	23,5	21,6	0,702	0,957 <sub>r</sub>
Cuatro especies	11,8	5,9			11,8	7,8		
Cinco especies	0,0	2,0			2,0	2,0		

Uno: observador 1

Dos: observador 2

Phi: concordancia de independencia-azar

**Tabla 7.** Características epidemiológicas de la población estudiada

Variables		Zona Rural	Zona Urbana global	%
<b>1. Características demográficas y socio-económicas</b>				
<i>Edad en años</i>	18-29	43	23	51
	30-44	23	9	25
	> 45	5	20	19
	Sin dato	3	3	4,7%
<i>Sexo</i>	Hombre	32	14	37,5
	Mujer	40	42	63,3
	Sin dato	0	1	0,8
<i>Nivel de educación</i>	Primaria	18	32	38
	Secundaria	7	17	18,6
	Técnico	0	1	0,8
	Universidad	0	1	0,8
	Ninguno	47	3	38,8
<b>2. Condiciones higiénico-sanitarias</b>				
<i>Agua potable para consumo</i>	Si	1	20	16,3
	No	70	35	81,4
	Sin dato	1	2	2,3
<i>Tipo de sanitario</i>	Letrina	15	1	12,4
	Sanitario	12	47	45,7
	Otro	4	7	8,5
	Ninguno	40	1	31,8
	Sin dato	1	1	1,6
<i>Origen del agua</i>	Acueducto	0	19	14,7
	Nacimiento	45	31	58,9
	Tanque de agua	24	6	23,2
	Otro	2	0	1,6
	Sin dato	1	1	1,6
<i>Tipo de piso de la vivienda</i>	Tierra	25	10	27,1
	Cemento	1	26	20,9
	Baldosa	0	1	0,7
	Madera	46	19	50,4
	Sin dato	0	1	0,7
<b>3. Antecedentes personales</b>				
<i>Presenta diarrea con frecuencia</i>	Si	45	27	55,8
	No	26	28	41,9
	Sin dato	1	2	2,3
<i>Hierve el agua para consumo</i>	Si	40	21	47,2
	No	31	35	51,2
	Sin dato	1	1	1,6
<i>Convivencia con animales</i>	Si	46	40	66,7
	No	25	16	31,8
	Sin dato	1	1	1,6
<i>Acostumbra a caminar descalzo</i>	Si	62	22	65,1
	No	8	34	32,6
	Sin dato	2	1	2,3

**Tabla 8.** Número de muestras positivas para cada parásito, estratificadas según el grupo de individuos analizado y el método de diagnóstico empleado.

Parásito	Método de diagnóstico									
	Zona Rural					Zona Periurbana				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>Nemátodos</b>										
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	3	0	0	6	0	1	1	0	23
<i>Ascaris lumbricoides</i>	27	27				10	10			
<i>Trichuris trichiura</i>	38	39				9	10			
<i>Necator americanus</i>	9	0				13	0			
<i>Hymenolepis nana</i>	9	10				5	3			
<i>Paragonimus spp</i>	1	1				0	0			
<b>Protozoos</b>										
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	23	27				15	17			
<i>E. hatmanni</i>	9	7				8	15			
<i>Entamoeba coli</i>	10	15				16	9			
<i>Endolimax nana</i>	19	23				18	23			
<i>Iodamoeba butschli</i>	3	4				5	8			
<i>Giardia intestinalis</i>	7	13				1	2			
<i>Chilomastix mesnillii</i>	4	4				1	4			
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1	0				0	0			
<i>Blastocystis spp</i>	25	42				22	28			

1: Examen directo de heces; 2: Ritchie modificado; 3: Cultivo en placa de agar; 4: Harada–Mori; 5: qPCR.

**Tabla 9.** Tabla de resultados obtenidos en la qPCR para las muestras de materia fecal evaluadas.

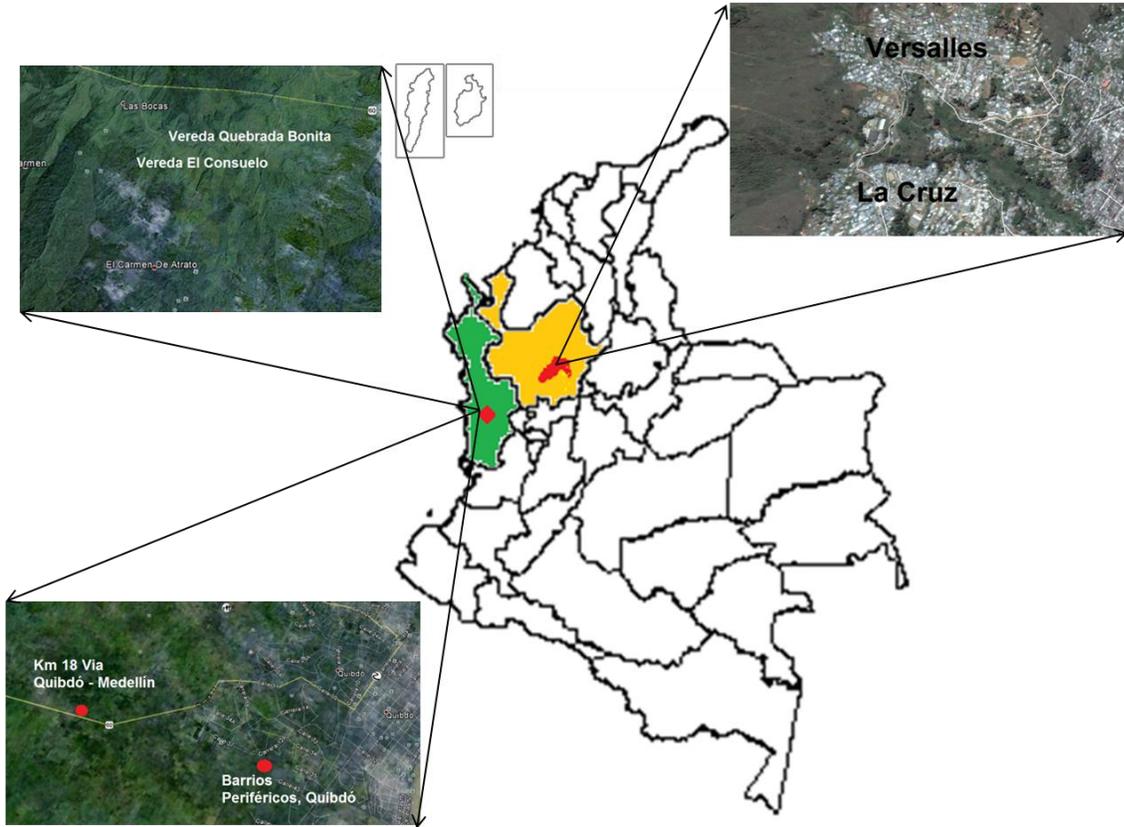
<b>Código</b>	<b>Ct</b>	<b>Código</b>	<b>Ct</b>	<b>Código</b>	<b>Ct</b>	<b>Código</b>	<b>Ct</b>
<b>A1</b>	34	<b>H1</b>	40	<b>S3</b>	36	<b>N7</b>	<u>29</u>
<b>A2</b>	39	<b>H2</b>	40	<b>S4</b>	34	<b>N8</b>	<u>28</u>
<b>A3</b>	39	<b>H3</b>	37	<b>S6</b>	35	<b>N10</b>	<u>29</u>
<b>A4</b>	34	<b>H4</b>	40	<b>S7</b>	35	<b>N11</b>	39
<b>A5</b>	38	<b>H5</b>	40	<b>S8</b>	35	<b>N12</b>	<u>29</u>
<b>A6</b>	38	<b>H6</b>	39	<b>S9</b>	38	<b>N13</b>	<u>29</u>
<b>A7</b>	40	<b>H7</b>	39	<b>S10</b>	40	<b>N14</b>	<u>28</u>
<b>A8</b>	34	<b>H8</b>	37	<b>S11</b>	35	<b>N15</b>	<u>28</u>
<b>A9</b>	33	<b>H9</b>	40	<b>S12</b>	40	<b>N16</b>	<u>28</u>
<b>A10</b>	34	<b>H10</b>	40	<b>S13</b>	38	<b>N17</b>	29
<b>B1</b>	38	<b>I1</b>	40	<b>S14</b>	36	<b>N18</b>	<u>28</u>
<b>B2</b>	40	<b>I2</b>	37	<b>S15</b>	40	<b>N19</b>	<u>29</u>
<b>B3</b>	34	<b>I3</b>	40	<b>S16</b>	37	<b>N20</b>	40
<b>B4</b>	31	<b>I4</b>	36	<b>S17</b>	40	<b>N21</b>	32
<b>B5</b>	30	<b>I5</b>	40	<b>S18</b>	34	<b>N22</b>	<u>28</u>
<b>B6</b>	37	<b>I6</b>	33	<b>S19</b>	40	<b>N23</b>	<u>28</u>
<b>B7</b>	37	<b>I7</b>	40	<b>M1</b>	<u>28</u>	<b>N24</b>	<u>28</u>
<b>B8</b>	40	<b>I8</b>	<u>28</u>	<b>M2</b>	33	<b>N25</b>	<u>28</u>
<b>B9</b>	40	<b>I9</b>	<u>29</u>	<b>M3</b>	40	<b>N26</b>	<u>29</u>
<b>F1</b>	38	<b>I10</b>	<u>29</u>	<b>M4</b>	<u>29</u>	<b>N28</b>	38
<b>F2</b>	39	<b>J1</b>	40	<b>M5</b>	32	<b>N29</b>	33
<b>F3</b>	40	<b>J2</b>	34	<b>M6</b>	40	<b>N30</b>	32
<b>G1</b>	37	<b>J3</b>	37	<b>M7</b>	40	<b>N31</b>	38
<b>G2</b>	38	<b>J4</b>	40	<b>M8</b>	34	<b>N32</b>	33
<b>G3</b>	39	<b>J5</b>	40	<b>M9</b>	38	<b>N33</b>	<u>29</u>
<b>G4</b>	37	<b>J6</b>	39	<b>M10</b>	40	<b>N34</b>	<u>29</u>
<b>G5</b>	40	<b>J7</b>	37	<b>N1</b>	<u>29</u>	<b>N35</b>	<u>29</u>
<b>G6</b>	34	<b>J8</b>	38	<b>N2</b>	40	<b>N41</b>	<u>28</u>
<b>G7</b>	40	<b>J9</b>	<u>29</u>	<b>N3</b>	40	<b>N45</b>	31
<b>G8</b>	34	<b>J10</b>	34	<b>N4</b>	38	<b>N46</b>	39
<b>G9</b>	40	<b>S1</b>	39	<b>N5</b>	<u>26</u>	<b>N47</b>	33
<b>G10</b>	40	<b>S2</b>	38	<b>N6</b>	<u>28</u>		
<b>Controles Positivos</b>							
<b>SF1</b>	23	<b>SF 2</b>	28	<b>SF3</b>	29	<b>SF4</b>	29

Ct: valor umbral del ciclo de amplificación. Los códigos de la A-S corresponden a muestras de materia fecal provenientes de la zona rural del Chocó; M1-M10 muestras de la zona periurbana del Chocó; muestras N1-N47 de la zona periurbana del municipio de Medellín.

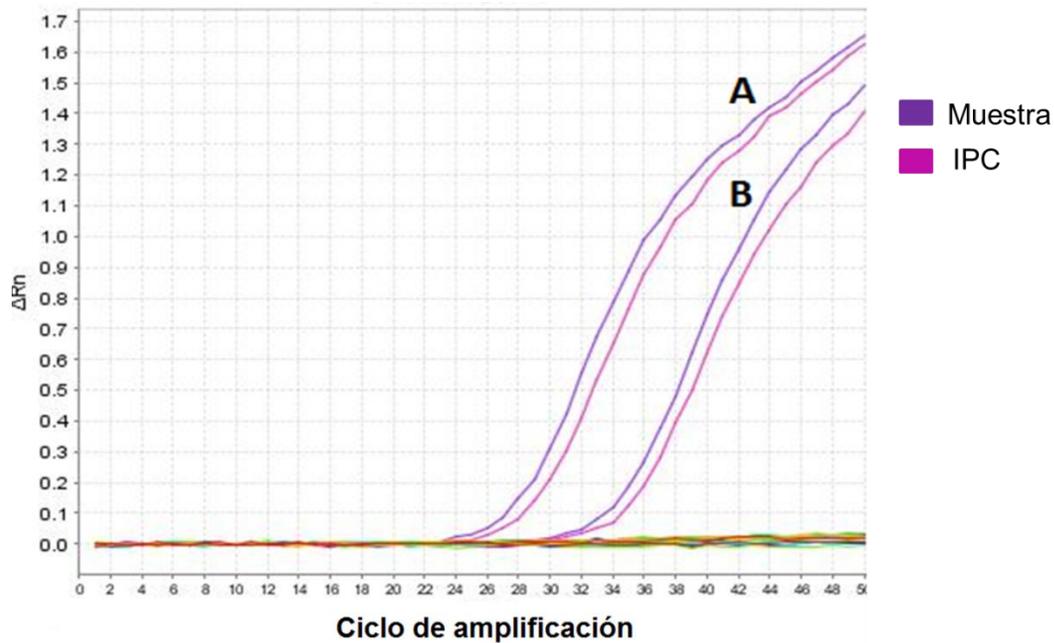
**Tabla 10.** Estimación de las características operativas de la qPCR.

<b>Parámetro</b>	<b>Valores obtenidos de la comparación de las pruebas (%)</b>	<b>IC 95%</b>
Sensibilidad	75,0	20,07-100
Especificidad	79,2	71,68-86,72
Valor predictivo positivo	10,3	0,0-23,15
Valor predictivo negativo	99,0	96,55-100
Proporción de falsos positivos	20,6	14,5-28,5
Proporción de falsos negativos	25,0	4,6-69,9
Exactitud	79,2	71,5-85,3
<i>Odds ratio</i> diagnóstica	11,54	1,15-115,55
Índice J de Youden	0,54	
CPP o LR(+)	3,61	1,86-6,98
CPN o LR(-)	0,32	0,06-1,73
Probabilidad pre-prueba (Prevalencia)	3,1%	
Índice de validez	79,07	71,66-86,48

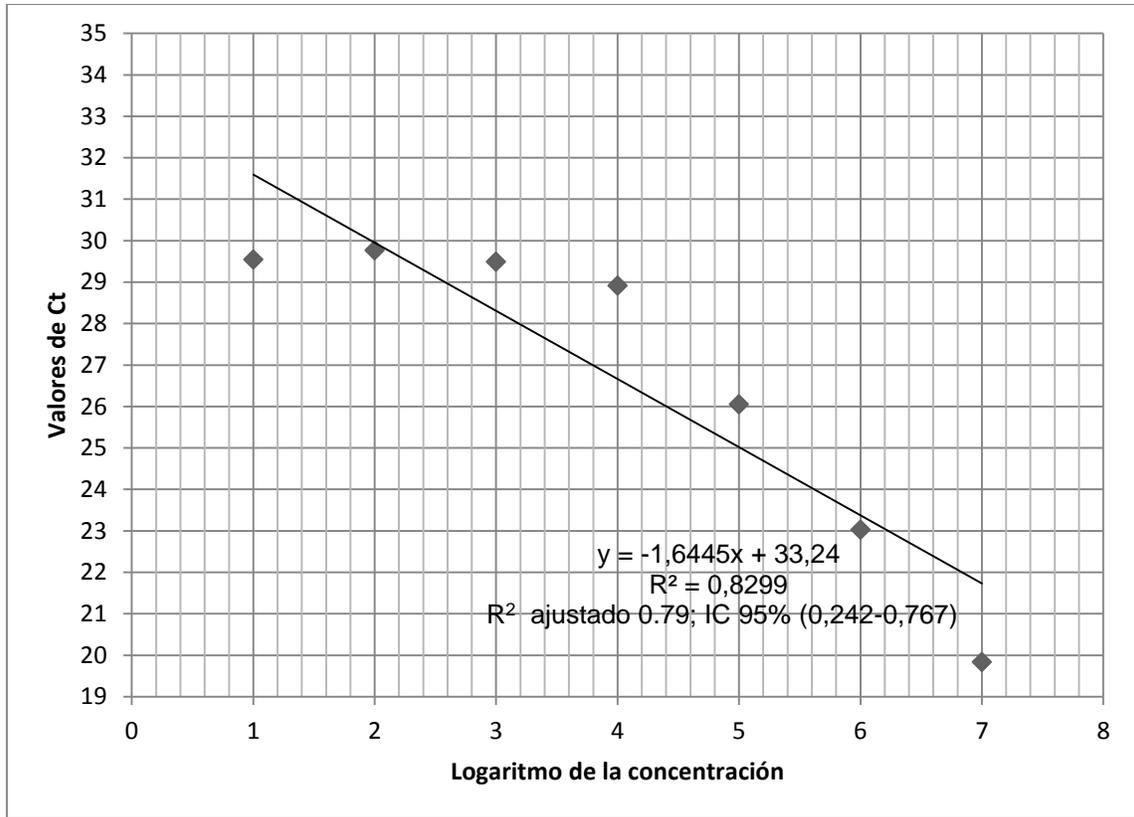
CPP: cociente de probabilidad positiva; CPN: cociente de probabilidad negativa; LR: *likelihood ratio*



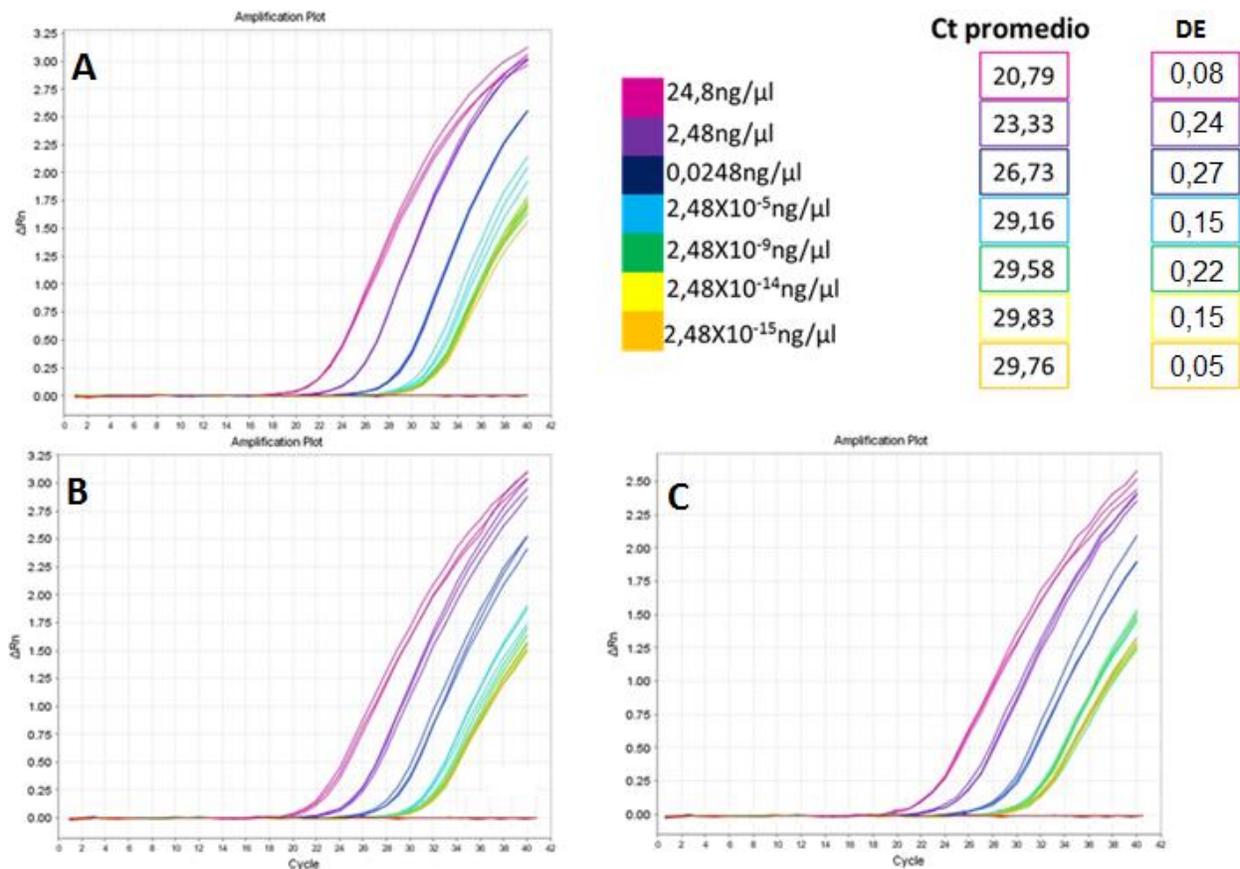
**Figura 1.** Mapa de las zonas muestreadas en el departamento del Chocó (en verde) y en el departamento de Antioquia (en amarillo).



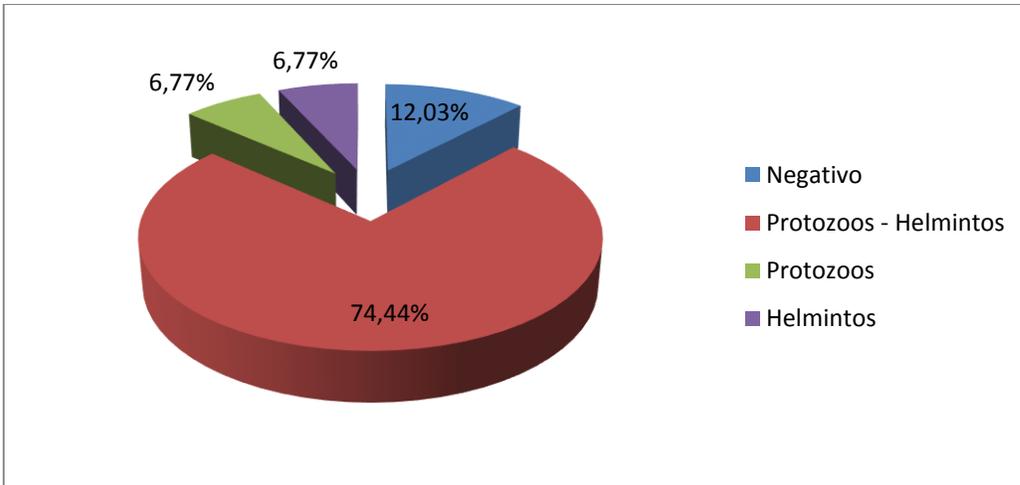
**Figura 2.** Curva de amplificación (Ct) de un control positivo para *S. stercoralis* extraído con QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN® y DNA Stool Mini Kit QIAGEN®. Valores del ciclo de amplificación. **A.** curva de amplificación de un control positivo extraído con QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN® (Ct=28) y el Ct del IPC (Ct=29). **B.** curva de amplificación del mismo control positivo extraído con DNA Stool Mini Kit QIAGEN® (Ct=35) y el Ct del IPC (Ct=36).



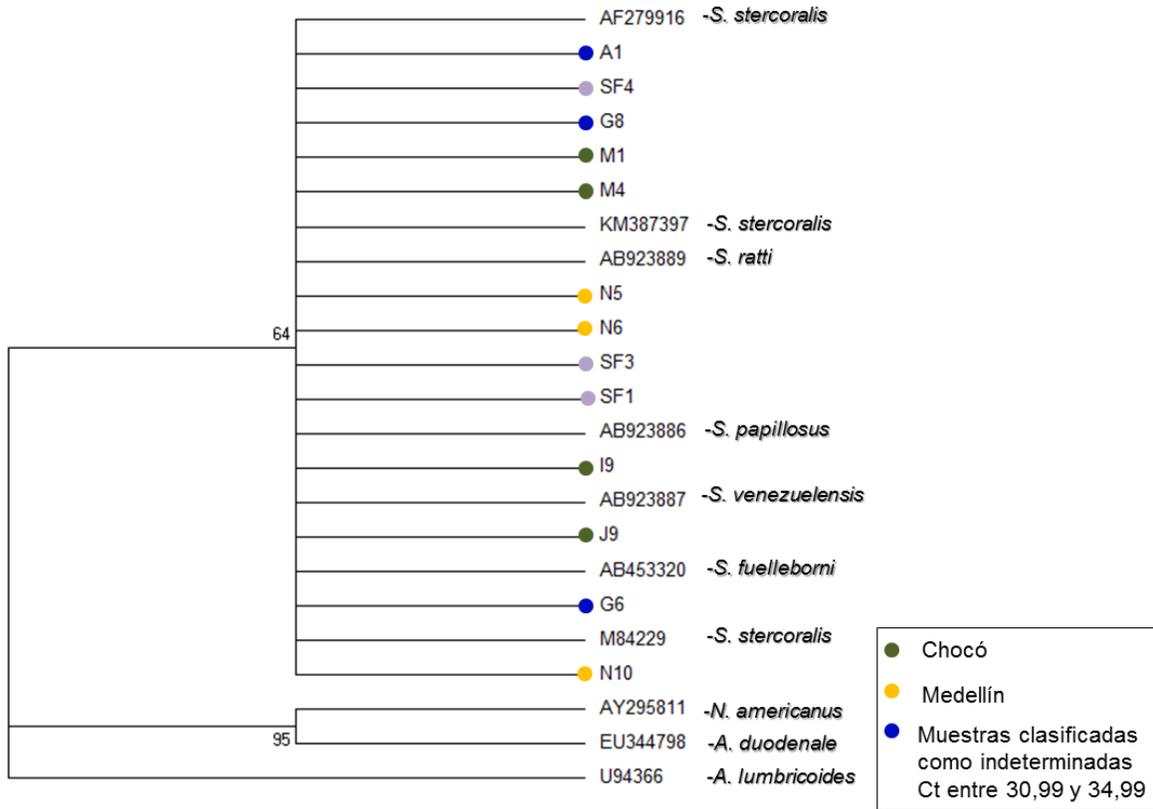
**Figura 3.** Curva estandar para determinar la eficiencia de la qPCR



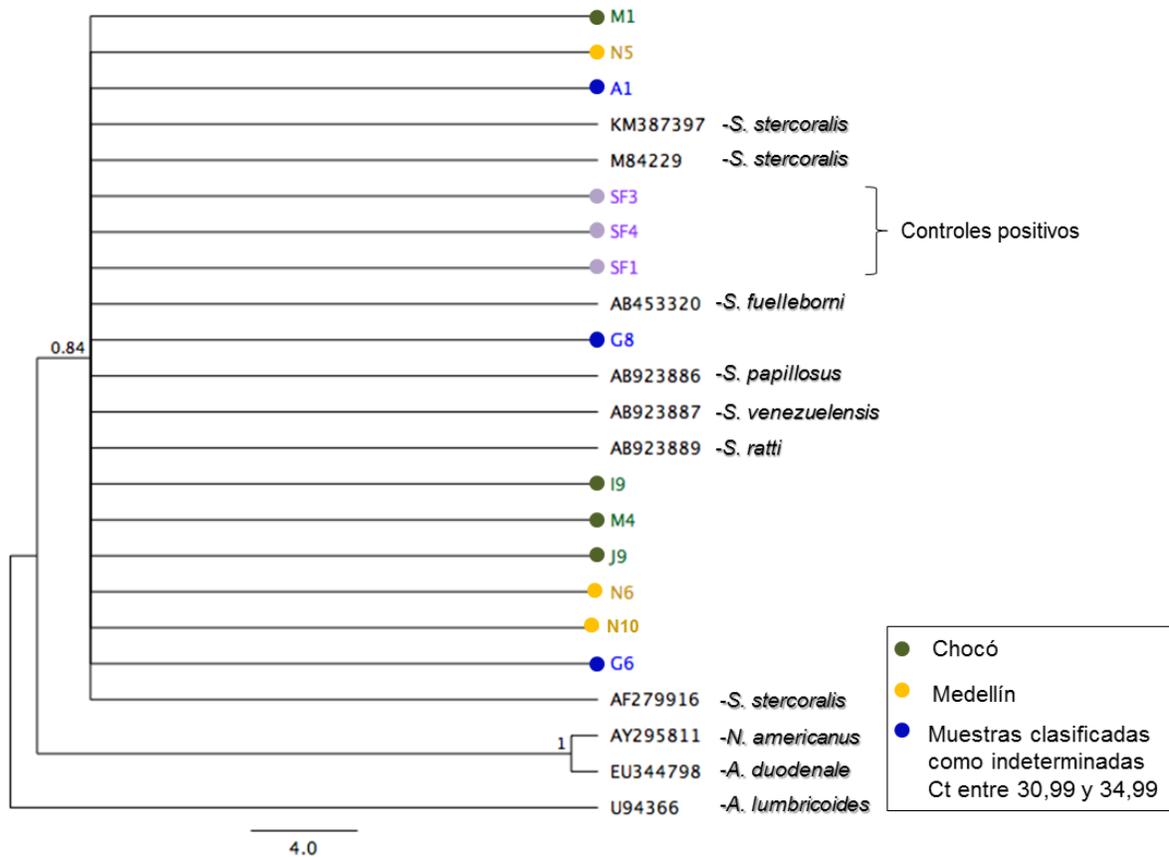
**Figura 4:** Curvas de amplificación de diluciones de los controles positivos, concentración inicial 24,8ng/μL concentración final 2,48x10<sup>-15</sup> ng/μL. Ct: Valores del ciclo umbral de amplificación. En **A**, **B** y **C** se muestran las curvas de amplificación correspondientes a reacciones corridas en tres días diferentes. Cada color representa a una concentración de la muestra. También se observa los valores de Ct promedio y la desviación (DE) estándar de cada uno.



**Figura 5.** Frecuencia de parasitismo Global estimada mediante métodos de diagnóstico parasitológicos tradicionales.



**Figura 6.** Dendrograma obtenido por consenso para las secuencias parciales del gen 18S de RNA ribosomal de este estudio y reportadas en el NCBI, mediante análisis de máxima verosimilitud basado en el modelo JC. El valor sobre las ramas indica el porcentaje de Bootstrap (1000 pseudoreplicas).



**Figura 7.** Dendrograma obtenido por consenso para las secuencias parciales del gen 18S de RNA ribosomal obtenidas en este estudio y reportadas en el NCBI, usando Inferencia Bayesiana basada en el modelo JC. El valor sobre las ramas indica la probabilidad *a posteriori*.