



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO, ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA
MOLECULAR PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE ADN DEL TREMATODO *Amphimerus spp.*
EN METACERCARIAS OBTENIDAS DE PECES.

Autora

María Belén Proaño Montenegro

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO, ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA
MOLECULAR PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE ADN DEL TREMATODO *Amphimerus* spp. EN
METACERCARIAS OBTENIDAS DE PECES.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

Ph.D Manuel Calvopiña Hinojosa

Autor

María Belén Proaño Montenegro

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Desarrollo, estandarización y aplicación de la técnica molecular PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de ADN del trematodo *Amphimerus* spp. en metacercarias obtenidas de peces, a través de reuniones periódicas con la estudiante María Belén Proaño Montenegro, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Segundo Manuel Calvopiña Hinojosa
Doctor en Enfermedades Infecciosas
C. I. 0501308415

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Desarrollo, estandarización y aplicación de la técnica molecular PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de ADN del trematodo *Amphimerus* spp. en metacercarias obtenidas de peces, del estudiante María Belén Proaño Montenegro, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Carlos Andrés Bastidas Caldes
Master of Science en Microbiología
C. I. 0201619806

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

María Belén Proaño Montenegro
C. I. 1716381312

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo dándome fuerza bondad y amor.

Agradezco a la Dirección General de Investigación de la UDLA por permitirme realizar el proceso investigativo en sus instalaciones.

Un especial agradecimiento a la M.Sc. Irina Villacrés por su generosa ayuda, paciencia y dedicación. Al M.Sc. Germán Burgos por su valiosa colaboración.

Finalmente, quiero expresar mi más grande agradecimiento al Dr. Manuel Calvopiña por confiar en mí, ya que sin sus valiosos conocimientos y consejos no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres Paúl y Thania, que siempre están junto a mí, quienes con su esfuerzo, paciencia y amor me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí virtudes y valores, además de ser ejemplo de fortaleza y constancia en todo momento.

Gracias a mi hermano Paúl por llenarme de alegría día tras día y por estar conmigo en todo momento, a toda mi familia, en especial a mis abuelitos, porque con sus consejos hicieron de mí una mejor persona.

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí dentro y fuera de las aulas, los llevaré siempre en mi corazón.

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a las trematodiasis como enfermedades tropicales olvidadas. En el Ecuador existen 3 trematodiasis que son prevalentes persistentes en zonas tropicales, paragonimiasis, fasciolosis y amphimeriasis. La amphimeriasis que fue recientemente y por primera vez descrita en Ecuador, es considerada una enfermedad emergente, infectando personas, gatos y perros en las provincias de Esmeraldas y Manabí. *Amphimerus* spp. se localiza aloja en las vías biliares de los infectados causando enfermedad. El ciclo de vida de *Amphimerus* requiere de 2 hospederos intermediarios; los primeros son invertebrados (caracoles de río) mientras que los segundos son varias especies de peces de agua dulce. La infección se produce por la ingestión de peces crudos o mal cocidos infectados con metacercarias del parásito. La identificación de las metacercarias en los peces se realiza por disección, digestión artificial y observación microscópica; sin embargo, la sensibilidad, especificidad y eficiencia se ven afectadas por esta técnica laboriosa. Por esta razón, se requiere del desarrollo de técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR) para la identificación rápida y específica de ADN del *Amphimerus* en diferentes especies de peces en las zonas endémicas. En esta investigación se estandarizó una PCR en Tiempo Real usando cebadores diseñados *in house* dirigidas a la región *ITS2* de *Amphimerus*, se estandarizó por medio de gradientes de temperatura de hibridación y denaturación; y variaciones en la concentración de cebadores. En el ciclo de umbral (Ct) resultante de cada variación no se encontró diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, los parámetros seleccionados fueron los que contenían un menor Ct debido al mayor porcentaje de sensibilidad. Las curvas de calibrado obtenidas mantuvieron una eficiencia mayor al 90% y coeficiente de correlación (R^2) mayor al 0.98, indicando que el nivel de confiabilidad de la técnica realizada es alto. La técnica identifica 1 metacercaria y concentración de ADN de 0,05 ng/ μ l. La especificidad se determinó comparando ADN de dos trematodos *Paragonimus* y *Fasciola* encontrando que los cebadores fueron específicos

para *Amphimerus*. En experimentos con músculo de pez infectado se determinó que el peso o la cantidad de músculo afecta la detección ADN de *Amphimerus*. En conclusión, la técnica desarrollada de PCR en Tiempo Real demostró ser altamente sensitiva, específica y confiable en la detección del trematodo *Amphimerus* spp. en estado de metacercaria encontrados en peces. Esta técnica podría aplicarse para diferenciar las especies de peces portadoras del parásito, para así educar a las personas en riesgo en la prevención de la infección y tomar medidas de control/eliminación efectivas en la comunidad.

Palabras clave: *Amphimerus* spp., PCR en tiempo real, Amphimeriasis, Trematosis, Técnicas moleculares.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) considers trematode infections as neglected tropical diseases. In Ecuador there are 3 trematodiasis that are prevalent in tropical zones, paragonimiasis, fasciolosis and amphimeriasis. Amphimeriasis was recently and for the first time described in Ecuador, considered an emerging disease, infecting people, cats and dogs in the provinces of Esmeraldas and Manabí. *Amphimerus* spp. is in the bile ducts of the infected causing disease. The life cycle of *Amphimerus* requires 2 intermediate hosts; the first ones are invertebrates (river snails) while the second ones are several species of freshwater fish. The infection is caused by the ingestion of raw or undercooked fish infected with metacercarie. The identification of metacercarie in fish is done by dissection, artificial digestion and microscopic observation; However, sensitivity, specificity and efficiency are affected by this laborious technique. For this reason, the development of molecular techniques such as real-time PCR (qPCR) is required for the rapid and specific identification of *Amphimerus* DNA in different fish species in endemic areas. In this research, a Real Time PCR was standardized using *in house* designed primers directed to the *ITS2* region of *Amphimerus*, it was standardized by gradients of temperature of hybridization and denaturation; and variations in the concentration of primers. No statistically significant differences were found in the threshold cycle (Ct) resulting from each variation; however, the parameters selected were those that contained a lower Ct due to the higher percentage of sensitivity. The calibration curves obtained maintained an efficiency greater than 90% and a correlation coefficient (R^2) greater than 0.98, indicating that the level of reliability of the technique performed is high. The technique identifies 1 metacercarie and a DNA concentration of 0.05 ng/ μ L. The specificity was determined by comparing DNA from two trematodes *Paragonimus* sp. and *Fasciola* sp., finding that the primers were specific for *Amphimerus*. In experiments with infected fish muscle, was determined that the weight or the amount of muscle affects the DNA detection of *Amphimerus*. In conclusion, the developed technique of Real Time PCR proved to be highly

sensitive, specific and reliable in the detection of the trematode *Amphimerus* spp. in metacercarie state found in fish. This technique could be applied to differentiate and incriminate the species of fish carrying the parasite, in order to educate people at risk in the prevention of infection and take effective control/elimination measures in the community.

Key words: *Amphimerus* spp., Real time PCR, Amphimeriasis, Trematosis, Molecular techniques.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Objetivos.....	7
1.4. Justificación de la Investigación.....	8
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Enfermedades Emergentes y Reemergentes.....	10
2.2. Enfermedades tropicales desatendidas (NTD).....	11
2.3. Definición de Parasitosis y Trematodiasis	13
2.4. Trematodiasis en el Ecuador	17
2.5. Amphimeriasis.....	20
2.5.1. Amphimerus spp.....	20
2.5.2. Clasificación taxonómica	21
2.5.3. Morfología.....	22
2.5.4. Ciclo de vida	25
2.5.5. Distribución Geográfica	26
2.6. Identificación de fuente alimentaria e incriminación de segundo huésped intermediario (peces).....	32
2.7. Técnicas de identificación de Amphimerus spp.	34
2.7.1. Microscopía	34
2.7.2. Técnicas Inmunológicas	36
2.7.3. Técnicas Moleculares	37
2.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	38
2.9. PCR en Tiempo Real.....	39
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	43
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	44

4.1. Obtención de metacercarias (estadio larvario) y parásitos adultos de <i>Amphimerus</i> spp.	44
4.1.1. Obtención de Metacercarias de <i>Amphimerus</i> spp.	44
4.1.2. Obtención de parásitos adultos de <i>Amphimerus</i> spp.	45
4.2. Obtención de tejidos blandos de peces e infección.	45
4.2.1. Obtención y procesamiento de Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	45
4.2.2. Infección de músculo de trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) con metacercarias de <i>Amphimerus</i>	46
4.3. Extracción de ADN de metacercarias y de parásito adulto. .	47
4.3.1. Extracción de ADN de metacercarias (estadio larvario) de <i>Amphimerus</i> spp.	47
4.3.2. Extracción de ADN del parásito adulto de <i>Amphimerus</i>	48
4.3.3. Extracción de ADN de músculo de trucha infectado con metacercarias, ADN <i>Amphimerus</i> spp. y control negativo	48
4.4. Diseño de Cebadores.....	49
4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	50
4.5.1. Experimento 1: Gradiente de temperatura de hibridación	52
4.5.2. Experimento 2: Gradiente de temperatura de denaturación	53
4.5.3. Experimento 3: Gradiente de concentración de cebadores	53
4.5.4. Análisis estadístico	53
4.5.5. Curva de calibrado: GenBlock	53
4.5.6. Curva de calibrado: <i>Amphimerus</i> adulto.....	54
4.5.7. Sensibilidad: Número de metacercarias	55
4.5.8. Sensibilidad: Concentración de ADN inicial.....	55
4.5.9. Especificidad de la Técnica	55
4.5.10. Muestras: Tejido de pez trucha infectado con <i>Amphimerus</i> spp.....	56
4.5.11. Cuantificación absoluta	57

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.1. Estandarización de la técnica molecular PCR en Tiempo Real.....	57
5.1.1. Experimento 1: Gradiente de temperatura de hibridación	57
5.1.2. Experimento 2: Gradiente de Denaturación (93-95°C)	60
5.1.3. Experimento 3: Gradiente de Cebadores	61
5.2. Análisis estadístico.....	63
5.3. Curvas de calibrado	64
5.3.1. Curva de calibrado: GenBlock (Región ITS2).....	64
5.3.2. Curva de calibrado: Amphimerus adulto.....	68
5.4. Sensibilidad.....	71
5.4.1. Sensibilidad por número de metacercarias.....	71
5.4.2. Sensibilidad por concentración de ADN	73
5.5. Especificidad empleando ADN de otros trematodos (Paragonimus y Fasciola).....	76
5.6. Muestras: Tejido de pez trucha infectado con Amphimerus spp.....	77
5.6.1. Experimento 1: Músculo de trucha infectado con ADN de Amphimerus adulto después de la extracción.	77
5.6.2. Experimento 2: Músculo de trucha infectado con ADN de Metacercaria después de la extracción.....	79
5.6.3. Experimento 3: Músculo de Trucha y metacercaria extracción con Chelex 1 y 2	81
5.7. Cuantificación absoluta	85
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
6.1. Conclusiones	87
6.2. Recomendaciones.....	89
REFERENCIAS	89

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El ser humano se encuentra expuesto constantemente a infecciones por organismos causantes de enfermedades que pueden ser perjudiciales para su salud. Algunas de estas enfermedades son causadas por parásitos que viven a expensas de otros organismos, entre estos el ser humano, ya que se alimentan y se reproducen dentro o fuera de él, llegando inclusive a ser mortal (Sripa, 2016; Solomon, 2008).

Existen dos tipos de parásitos que pueden causar enfermedades al ser humano: Ectoparásitos, como artrópodos hematófagos; y endoparásitos, como: Protozoos y Helminthos. Los cuales se encuentran distribuidos alrededor del mundo e infectan a millones de personas.

Las áreas más afectadas son las zonas tropicales de países en vías de desarrollo, en donde se encuentra una mayor prevalencia de infectividad en las personas. Los helmintos son metazoarios, gusanos que infectan por lo general a vertebrados, en los cuales se desarrollan y llegan a habitar incluso de por vida en un animal hospedero (Lin, 2018). Dentro de los helmintos de encuentran los Platyhelminthes y dentro de estos las clases trematoda, cestoda y nematoda. Una especie de trematodo recientemente reportada en el Ecuador, que infecta a los seres humanos, es *Amphimerus* spp. el cual pertenece a la Clase: Trematoda, Orden: Opisthorchiida, Familia: Opisthorchiidae, del Género: *Amphimerus* (Calvopiña, 2015). *Amphimerus* spp. son gusanos planos, que parasitan las vías biliares, de entre 8-13.6 mm de largo de y 0.5-1.1 mm de ancho con una tonalidad rosada en estado adulto, son semejantes a los géneros *Clonorchis* sp. y *Oposthorchis* sp. por lo que pueden llegar a ser confundidas entre sí (Zheng, 2016). Al momento se han reportado 14 especies de *Amphimerus* en diferentes países, esta identificación es basada en características morfológicas y morfométricas (Calvopiña, 2011).

Este trematodo descrito en Manabí en el año de 1949 fue reportado inicialmente como *Opisthorchis guayaquilensis*, que posteriormente fue nombrado como *Amphimerus* spp.,(Calvopiña, 2015). Sin embargo, en descripciones posteriores los parásitos aislados en Esmeraldas y Manabí se identificaron usando diferencias morfológicas y morfométricas entre ambas especies como: 1) la división de la vitelaria, grupo de glándulas que secretan una sustancia viscosa, la cual se divide en 2 grupos posteriores y 2 grupos anteriores. Los grupos posteriores llegan hasta la parte posterior de los testículos, los cuales se caracterizan por ser ligeramente lobulados o redondeados, a diferencia de otras especies de la familia Opisthorchiidae, cuya vitelaria no se divide en grupos y llega a un límite máximo de la parte frontal de los testículos, 2) otra característica que difiere a *Amphimerus* spp. con otras especies es que la ventosa oral es más pequeña que la ventral, característica que es opuesta en otras especies (Calvopiña, 2011; Rueda, 2016).

El trematodo *Amphimerus* spp. llega a infectar a mamíferos domésticos y salvajes a lo largo del continente americano, varios estudios indican que entre los mamíferos con más incidencia de infección son: perros, gatos, roedores y marsupiales. La infección humana hasta ahora solo se ha reportado en Ecuador (Calvopiña, 2015). Los países en donde se ha registrado la infección en animales por este trematodo son, en América del norte: Estados Unidos y Canadá, Centro América: Panamá y Costa Rica, América del Sur: Brasil, Perú, Ecuador y Colombia. Varias especies de reservorios se infectan por medio de la ingestión de peces mal cocidos o crudos de agua dulce de ríos y lagos de las zonas tropicales, es decir, que se trata de una enfermedad transmitida por alimentos (WHO, 2018). Los peces son el segundo huésped intermediario dentro del ciclo vital del trematodo; el estado parasitario de metacercaria es la forma infectante de este trematodo que se encuentra en el músculo de peces (Cevallos, 2017).

El ciclo de vida de la clase trematoda, son muy parecidos, y requiere de una serie de individuos intermediarios antes de llegar al hospedero definitivo. Los primeros intermediarios son invertebrados como los caracoles. Dentro de los

caracoles, los trematodos pasan por 4 etapas de metamorfosis: miracidio, esporocito, redias y finalmente cercarias, la cuarta y última faceta contiene un flagelo que les permite moverse en el agua (Zemmer, 2017). El segundo huésped intermediario puede ser un vertebrado o invertebrado dependiendo del ciclo específico del género. En el caso de los parásitos pertenecientes a la familia Opisthorchiidae, son peces de diferentes géneros y especies, siempre de agua dulce. Finalmente, el ciclo involucra un mamífero como hospedero final (Palomino, 2014; Zemmer, 2017). Particularmente el ciclo de vida de *Amphimerus* spp. es similar al de *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* y *Opisthorchis felinus*, (CDC, 2016).

En el Ecuador se ha demostrado mediante el estudio de Calvopiña y colaboradores (2011) que la prevalencia de *Amphimerus* spp. se encuentra en un 34% en los pobladores indígenas de las comunidades Chachis, en las zonas endémicas del Río Cayapas. Los pobladores de esta zona ingieren platos típicos de la región, los cuales consisten en pescado de río ahumado o cocido con limón, lo que indica la fuente de infección (Cevallos, 2017). Posteriores estudios demostraron que la infección por el trematodo *Amphimerus* spp. no solamente afecta a los seres humanos, sino que también afecta a los animales domésticos como son los perros y gatos de la región del Río Cayapas (Calvopiña, 2015). Se cree que otros animales como aves piscícolas estarían también infectados manteniendo así un ciclo selvático que involucra a personas residentes en esas zonas boscosas. Por lo que se estima que los huevos de *Amphimerus* excretados por estos animales llegan al río para continuar el ciclo vital llegando a infectar al ser humano o viceversa. De esta manera se puede clasificar a la amphimeriasis como enfermedad zoonótica (Maleewong, 2003) y además, parasitosis transmitidas por alimentos, que afecta a países desarrollados como en vías de desarrollo (Bargues, 2017).

Debido a que *Amphimerus* es un parásito trematodo, se desarrolla en el primer huésped intermediario (moluscos) y el segundo huésped intermediario (peces), es necesario desarrollar métodos de detección que identifiquen y diferencien a *Amphimerus* spp. de otras especies de la familia *Opisthorchiidae* en estos

hospederos. Hasta el momento, se han desarrollado algunos métodos de detección de los estados larvarios para los trematodos de la familia *Opisthorchiidae* en los hospederos como: Microscopía, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), PCR convencional, PCR en Tiempo Real y ELISA (Cai, 2014).

La identificación de los estadios larvarios o intermedios de *Amphimerus* en los moluscos y peces, involucrados en el ciclo de vida de *Amphimerus*, es de gran importancia, no solo para el conocimiento epidemiológico, sino para implementar medidas de eliminación, control y prevención de la amphimeriasis. Hasta ahora, la identificación, ha sido realizada por medio de digestión artificial, disección en conjunto con microscopía para la búsqueda de metacercarias en los tejidos de los organismos intermediarios (Calvopiña, 2015, 2011). Para la obtención de los distintos estadios parasitarios, se requiere de una disección y digestión artificial de los organismos intermediarios, seguida de la observación microscópica para su detección (Estrada, 2014). Sin embargo, estas técnicas en conjunto no son del todo eficientes, sensibles, específicas y eficaces. Debido a que, en la disección y toma de muestra tisular de los intermediarios, el parásito puede o no encontrarse en la muestra tomada, lo que afecta a la sensibilidad. Estas técnicas en conjunto pueden tomar una gran cantidad de tiempo y recursos, por lo que no son eficientes. Los estadios parasitarios de la familia *Opisthorchiidae*, son similares entre sí y puede generar confusiones entre trematodos de distintas especies o incluso géneros, por lo que estas técnicas no son consideradas específicas (Costa, 2004). Por lo anteriormente expuesto, es indispensable la estandarización y empleo de técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección e identificación de ADN de *Amphimerus* en las diferentes especies de huéspedes (Palomino, 2014).

En el Ecuador, hasta el momento no se ha desarrollado ni aplicado la técnica de qPCR para el diagnóstico de la infección en humanos ni para la detección e incriminación de huéspedes intermediarios como moluscos y peces, ni en la identificación del trematodo en otros animales reservorios. Recientemente, se

estandarizó la técnica de PCR LAMP para la detección de ADN de *Amphimerus* en heces tanto frescas como guardadas en papel filtro (Cevallos, 2018). El desarrollo de nuevas técnicas moleculares es de gran importancia para la detección de *Amphimerus* spp., no solo en seres humanos sino también en individuos intermediarios, para la incriminación de los tipos y especies de animales en los cuales este trematodo puede desarrollarse.

La PCR en Tiempo Real o Cuantitativa es considerada una confiable alternativa, ya que en varios estudios se ha determinado que tiene una alta sensibilidad en la detección de ADN de otros trematodos de la familia Opisthorchiidae. Los estudios de Cai y colaboradores (2014) y de Kaewkong y colaboradores (2013), han determinado que la sensibilidad de la qPCR puede llegar a un límite mínimo de detección de 1pg de ADN. Esta técnica no solamente puede ser altamente sensible sino también específica, ya que puede contar con sondas marcadas con distintos fluoróforos, dando como resultado una amplificación específica del gen de interés (Life Technologies, 2012).

Por las razones antes expuestas es importante el desarrollo y aplicación de la qPCR para la detección de ADN de *Amphimerus* spp. no solo en humanos, como técnica diagnóstica, sino también en los organismos intermediarios (moluscos y peces) y determinar en qué otro tipo de animales tanto domésticos como silvestres puede desarrollarse este trematodo.

1.2. Planteamiento del problema

Un gran porcentaje de la población mundial se encuentra infectada por trematodos que pueden ser hepáticos, intestinales, pulmonares y sanguíneos. Las trematodiasis hepáticas entre las más importantes están la fascioliasis, clonorquiasis, opistoquiasis y amphimeriasis, son enfermedades transmitidas por alimentos, en el caso de las Opisthorchiidae por la ingesta de peces infectados, y la OMS las considera como enfermedades olvidadas o desatendidas (*Neglected Tropical Diseases* por sus siglas en inglés) (Bhattacharya, 2018) debido a que se presentan en poblaciones rurales y

generalmente pobres, donde los métodos de diagnóstico y de tratamiento que no son estudiados o no existen (Hotez, 2018). Estas infecciones son de gran impacto debido a las millones de personas infectadas alrededor del mundo. Entre la familia Opisthorchiidae que infectan las vías biliares están los géneros *Clonorchis* spp, *Opisthorchis* spp y *Amphimerus* spp con sus especies más representativas incluyendo *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* y *Amphimerus* spp. (Kaewkong, 2013).

Los géneros *Clonorchis* y *Opisthorchis* son prevalentes en el continente asiático, especialmente en los países de la costa este como: Corea, Taiwán, China, Japón, entre otros (Zheng, 2016). Mientras que el registro de la infección por *Amphimerus* a humanos solo se ha demostrado en Ecuador en especial en la zona costera del Río Cayapas en la provincia de Esmeraldas y en el cantón Jipijapa provincia de Manabí.

Los seres humanos y otros mamíferos y aves son infectados por medio del consumo de peces crudos o mal cocidos (Greter, 2017), se ha determinado que los pobladores ingieren pescado crudo en sus platos tradicionales y se ha observado que los animales domésticos como gatos y perros han adquirido habilidades de pesca en las orillas de río o comen los desperdicios crudos de estos animales acuáticos (Calvopiña, 2015).

En Ecuador, el 34% de los pobladores de las comunidades indígenas Chachi se encuentran infectados con *Amphimerus* spp. (Calvopiña, 2011). También se han encontrado en muestras de heces y disección del hígado de gatos y perros en la zona, por lo que se trata de una zoonosis, es decir que los parásitos pueden pasar de animales a humanos y viceversa (Calvopiña, 2015; Hortal, 2016).

Para la obtención de metacercarias, es necesario identificar el huésped intermediario, en el caso de la familia Opisthorchiidae son peces de agua dulce residentes en ríos de corriente lenta. Investigaciones realizadas por Lin, (2018); Molyneux, (2017); Sukontason, (1997), indican que, para la obtención

de metacercarias de *Opisthorchis* sp. y *Clonorchis* sp., es necesario capturar peces de agua dulce de las áreas endémicas, realizar disecciones de los tejidos blandos, digerir artificialmente con ácido clorhídrico más pepsina, y finalmente observar por medio de un estereomicroscopio o microscopio biológico la presencia de metacercarias en dichas muestras. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, en donde son utilizadas estas técnicas, se ha determinado que no son del todo sensibles, debido a que se puede pasar por alto la incidencia de metacercarias en la muestra (Kim, 2008); eficiente, debido al gasto de recursos y tiempo necesarios para la identificación de estos parásitos; y específicas, dicha propiamente a que los trematodos en estadio de metacercarias de la familia Opisthorchiidae son similares, lo que puede llegar a generar confusiones (Touch, 2009).

Debido a esta serie de inconvenientes, se ha desarrollado distintas técnicas moleculares, las cuales eliminan estos inconvenientes como la PCR punto final, PCR en Tiempo Real, técnicas inmunológicas (ELISA), PCR mediada por bucle (LAMP), etc. Estas técnicas han sido empleadas para la detección de trematodos en las especies *Clonorchis sinensis* (Yan, 2015) y *Opisthorchis viverrini* (Lamaningao, 2017).

Por lo que es importante desarrollar técnicas moleculares como la PCR en Tiempo Real que identifiquen al trematodo *Amphimerus* spp. en animales intermediarios, independientemente en el estado del ciclo de vida en el que se encuentren.

1.3. Objetivos

General:

Estandarizar la técnica molecular PCR en Tiempo Real para la detección de ADN de metacercarias del trematodo *Amphimerus* spp. en peces infectados experimentalmente.

Específicos:

- Identificar los parámetros concretos del termociclador para el desarrollo de la técnica.
- Determinar la sensibilidad de la técnica por medio de la identificación de la cantidad máxima y mínima de ADN que puede amplificar la técnica.
- Comprobar la técnica estandarizada en muestras de músculo de peces infectados con metacercarias de *Amphimerus* spp.

1.4. Justificación de la Investigación

La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas, en la correcta identificación de parásitos en otros organismos, es de alta importancia para la incriminación a éstos como reservorios, huéspedes intermediarios, vectores, infectados, etc. Por ende, el desarrollo de nuevas técnicas que cumplan con estos requisitos es requerida con urgencia. Entre estas el desarrollo de técnicas moleculares ha sido recientemente demandada en todos los campos de la Biología.

Con el reciente descubrimiento del trematodo de vías biliares, *Amphimerus*, que infecta a humanos en el Ecuador, en pobladores del Rio Cayapas-Esmeraldas y Pedro Pablo Gómez-Manabí, y siendo éste un trematodo de la familia Opisthorchiidae, se hace mandatorio determinar y evidenciar los huéspedes intermediarios (moluscos y peces) que están actuando y manteniendo el ciclo vital en estos nichos ecológicos y estas comunidades.

Además, técnicas o métodos que identifiquen, diferencien entre especies y cuantifiquen la infección natural de estos trematodos en los diferentes individuos dentro del ciclo vital del *Amphimerus*. Al momento, la identificación de *Amphimerus* en estos vertebrados e invertebrados dentro de la cadena epidemiológica y ciclo vital, involucra la captura, disección y digestión artificial de los huéspedes intermediarios, seguido de microscopía para la observación y cuantificación de las fases intermedias de este trematodo. En el caso particular

de *Amphimerus* para la identificación de las metacercarias en las diferentes estructuras y en especial en el músculo de los peces (Hortal, 2016). El desarrollo de nuevas técnicas moleculares, basadas en la detección de ADN, ha permitido aumentar la sensibilidad y especificidad. Estas ya se han aplicado en otros parásitos de la misma familia como *Clonorchis* y *Opisthorchis*.

La PCR en Tiempo Real (qPCR), tiene una serie de ventajas, en comparación con las técnicas anteriormente descritas, como, por ejemplo, alta sensibilidad de detección de ADN de hasta 1 pg, especificidad debido a la sonda marcada con fluoróforo, el tiempo de realización es menor al de las técnicas convencionales (Cai, 2014; Dung, 2014; Kaewkong, 2013).

En el Ecuador no se ha desarrollado ni estandarizado la qPCR hasta el momento en la detección de ADN directamente de hospederos, ni de reservorios para el trematodo de vías biliares *Amphimerus*. El desarrollo y estandarización de la qPCR para *Amphimerus* permitirá la identificación e incriminación de los peces implicados en la transmisión e infección del parásito tanto a animales como humanos, permitiendo así implementar medidas de intervención efectivas para el control y posible eliminación de esta parasitosis en el Ecuador y otros países endémicos de la infección.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Las enfermedades son tan antiguas, como la existencia de la vida en el planeta, han afectado y causado la muerte de miles de especies a lo largo de los años. El ser humano no es la excepción, desde antiguas civilizaciones hasta la actualidad, se han registrado un sinnúmero de enfermedades, que han provocado la muerte de miles y hasta millones de personas, como la peste negra, el cólera, la gripe española, etc. Las cuales han diezmando a la población y generado grandes cambios en la investigación científica (Baker, 2017; Schmid, 2015).

Sin embargo, hay reportes y publicaciones de nuevas enfermedades que son aún desconocidas o no son controladas o que re-aparecen causando verdaderas epidemias o afecciones crónicas. Estas son las llamadas enfermedades emergentes y re-emergentes, respectivamente. Muchas de estas predominan en medios rurales de regiones tropicales, y la mayoría de estas se encuentran en estado de abandono, faltando investigaciones para su diagnóstico, tratamiento, prevención, etc. Por cuanto la OMS las cataloga como enfermedades olvidadas (*Neglected Tropical Diseases*, por sus siglas en inglés) (WHO, 2010).

2.1. Enfermedades Emergentes y Reemergentes

Las enfermedades emergentes, son aquellas que involucran nuevos agentes patógenos y factores que adquieren un carácter epidémico, los cuales se convierten en una amenaza; o son enfermedades ya conocidas, que emergen en nuevas zonas, donde no se padecía anteriormente. Las enfermedades reemergentes son las que involucran un crecimiento de su amenaza, o futuro incremento, debido a varios factores, como, la falta de control de condiciones sanitarias en los asentamientos o resistencia a los medicamentos (Abreu, 2014; Morales, 2015).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, (CDC) por sus siglas en inglés, y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han registrado más de 50 enfermedades emergentes y reemergentes hasta el 2014, y se estima que cada año surgen nuevas enfermedades de este tipo que afectan a más personas a nivel mundial (Mackey, 2014).

El aparecimiento y re-aparecimiento de estas enfermedades, compone un complejo sistema, en el cual intervienen varios agentes como, el cambio climático, resistencia a medicamentos, falta de acceso a recursos médicos, situación económica de las zonas endémicas, turismo, entre otras, son causantes de la formación de nuevas enfermedades (Sánchez, 2015), uno de estos causantes, ha sido ignorado por décadas, el turismo, puede llegar a

hacer un vehículo para el transporte de patógenos de una zona a otra, lo que conlleva a la formación de mutaciones o cambios dentro y fuera del patógeno, para asegurar su sobrevivencia (Mackey, 2014).

Un alto porcentaje de la población afectada por estas enfermedades, son las comunidades de escasos recursos, debido a la falta de saneamiento en las condiciones de vida que poseen, falta de atención médica, asentamientos en zonas rurales y remotas, bajo o nulo acceso a agua potable, entre otras, son las principales causas de la proliferación de focos de infección (Hortal, 2015).

Los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos, (*NIH* por sus siglas en inglés), separa a las distintas enfermedades Emergentes y Reemergentes en 3 grupos. Grupo 1, enfermedades reconocidas en los últimos 20 años; Grupo 2, enfermedades reemergentes; Grupo 3, causadas o provocadas para bioterrorismo (Mackey, 2014). Varios institutos internacionales, también contienen su propia clasificación de estas enfermedades, por las distintas características pueden tener en común. Un ejemplo son, las enfermedades zoonóticas, las cuales se estiman que, entre el 60-75% de las enfermedades infecciosas emergentes a nivel mundial, que son transmitidas de una especie a otra (HEENEY, 2006) (Webster, 2016). Otro ejemplo de clasificación de estas enfermedades es, las Enfermedades Tropicales Desatendidas, (NTD por sus siglas en inglés), las cuales involucran a patógenos que se desarrollan exponencialmente en ambientes cálidos y húmedos, donde la población y los asentamientos son de escasos recursos y la proliferación del patógeno es cada vez mayor, mientras que el control disminuye debido a estas condiciones (Bhattacharya, 2018; Hotez, 2018).

2.2. Enfermedades tropicales desatendidas (NTD)

Existe un grupo de enfermedades que no han sido controladas o son ignoradas por los organismos nacionales e internacionales, son conocidas como Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD por sus siglas en inglés), son enfermedades principalmente ocasionadas por organismos como bacterias,

hongos, virus y parásitos. Este tipo de enfermedades se encuentran, en su mayoría, en los países pobres o en vías de desarrollo, especialmente en las zonas tropicales, donde las condiciones son favorables para distintos patógenos (Valenzuela, 2018). En estas zonas, casi todas las personas residentes, se encuentran infectadas por una NTD (Hotez, 2016). Esta predilección a las áreas tropicales es preocupante, ya que es en donde se encuentra la mayor concentración de comunidades pobres y de bajos recursos, donde no hay agua potable, falta de saneamiento e inadecuado alojamiento. Muchas de estas personas que viven bajo estas circunstancias pueden padecer, no solo una, sino varias NTD's (Feasey, 2010), como se puede observar en la Figura 1. La distribución de varias NTD's y la incidencia de estas en las zonas tropicales.

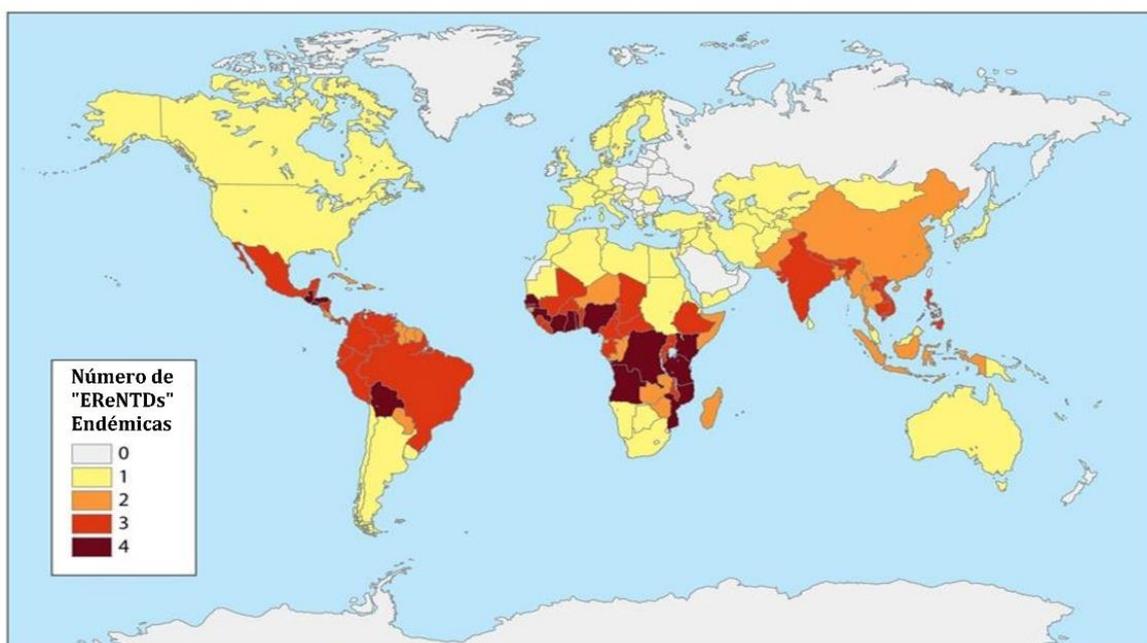


Figura 1. Distribución Geográfica de las NTD's a nivel mundial.

Tomado de (Mackey, 2014).

El efecto de estas enfermedades en las comunidades es de gran impacto a nivel económico, ya que genera efectos nocivos en el desarrollo cognitivo de los niños y bajas en la productividad de las personas, provocando de esta manera, un mayor índice de pobreza en los sectores de bajos recursos (Hotez,

2016). Se estima que las NTD's afectan a más de 1 billón de personas a nivel mundial, y es aún más preocupante que tan solo el 0,6% de los recursos emitidos a la salud, sean destinados a este tipo de enfermedades (Liese, 2009; Webster, 2016).

El hecho de que estas enfermedades se desarrollen en zonas pobres es una de las razones por las cuales, estas enfermedades han permanecido desatendidas, ya que la gente infectada reside en zonas rurales y remotas, lejos de la atención médica y la investigación. También, debido a los recursos limitados que poseen los países endémicos, se destina un bajo porcentaje a la salud. Otra razón es que no se consideran tan peligrosas como otras enfermedades, que pueden causar muertes en poco tiempo, ya que provocan sufrimiento en la persona que la padece, sin llegar a la muerte (WHO, 2010).

En el año 2012, entidades y organizaciones internacionales como la ONG y la OMS, junto con esfuerzos liderados de EE.UU. y Reino Unido, han realizado grandes avances, en cuanto a diagnóstico, tratamiento y prevención en 17 NTD's, por medio de medicamentos gratuitos, valorados en millones de dólares (Webster, 2016). Las enfermedades tratadas son la fascioliasis, lepra, leishmaniasis, filariasis linfática, oncocercosis, tripanosomiasis, helmintosis transmitida por el suelo, entre otras (Hotez, 2018) El objetivo principal de estos esfuerzos es controlar o erradicar estas enfermedades hasta antes del 2020, por medio de 5 estrategias: manejo intensivo de casos, quimioterapia preventiva, mejoramiento del agua y saneamiento, control de vectores, incluida la salud pública veterinaria (Johansen, 2015).

2.3. Definición de Parasitosis y Trematodiasis

Gran parte de las Enfermedades Tropicales Desatendidas son de origen parasitario, 12 de las 17 NTD's involucran a parásitos como helmintos y protozoos, que infectan y generan daño, interno como externo, en el hospedero (Hotez, 2014).

Las parasitosis, son enfermedades causadas por parásitos. Los parásitos son organismos, que viven a expensas de otro, tanto dentro como fuera del mismo, a estos organismos se les denomina hospedero (Bowman, 2014). Los parásitos, perjudican al hospedero, sin embargo, su presencia puede ser imperceptible o inaguantable, esto depende del tamaño del parásito, morfología, cantidad, órgano afectado, fuente alimenticia y ciclo de vida (Bogitsh, 2012; Kim, 2011). Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, (CDC por sus siglas en inglés), existen 3 tipos de parásitos que provocan enfermedades a los humanos, los cuales son: protozoos, artrópodos hematófagos y helmintos (CDC, 2016b). Los Protozoos, son organismos eucarióticos unicelulares, de carácter parasitario. Existen más de 20 000 organismos protozoarios descritos, los cuales han llegado a infectar al 25% de la población mundial, sin embargo, algunas de las enfermedades causadas por estos organismos, son consideradas como enfermedades tropicales desatendidas (NTD). Entre las 17 NTD's descritas por la OMS en el 2012, tres son causadas por protozoos (Kotowski, 2015; Webster, 2016).

Los artrópodos hematófagos, son ectoparásitos que se alimentan de sangre, viven en la piel de los animales por semanas o meses. También se consideran vectores de varias enfermedades, generando daños en la piel y en la salud humana (CDC, 2016; Kim, 1999; Mackey, 2014).

Finalmente, los Helmintos son organismos pluricelulares invertebrados de carácter parasitario, también son conocidos como gusanos parásitos, que pueden medir desde unos pocos milímetros a varios metros de largo. Los Helmintos han mantenido, como estrategia de vida al parasitismo con los mamíferos, y han evolucionado conjuntamente durante millones de años (Grencis, 2015). Se estima de 2 billones de personas a nivel mundial, se encuentran infectadas con este tipo de parásitos (Zaiss, 2015). Se clasifican en 3 grupos principales: Gusanos de cabeza espinosa (acantocéfalos), gusanos cilíndricos (nematodos) y gusanos planos (platelmintos), los cuales involucran a

cestodos como tenias y a duelas como los trematodos (CDC, 2016; Grencis, 2015).

La trematosis, son las enfermedades causadas por helmintos planos denominados trematodos (Johansen, 2015). Las cuales componen el mayor grupo de NTD, afectando a más de 40 millones de personas a nivel mundial, y colocando a más de 750 millones de personas, en peligro de infección (Hotez, 2008; Keiser, 2005). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 200 000 nuevos casos de personas infectadas por trematodos a nivel mundial son registrados cada año, y 7000 personas mueren en el mismo período de tiempo (WHO, 2018). También, por medio de datos obtenidos por la OMS, se estima que cada año se pierde 2 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD) (WHO, 2018).

Los trematodos pertenecen al Phylum Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea. Esta clasificación depende de la morfología del parásito, distribución geográfica y localización anatómica en el hospedador definitivo u órgano afectado (Retamal, 2016). Los trematodos, infectan a los hospedadores definitivos por medio de los alimentos, por lo que a estas enfermedades se conocen como, Enfermedades transmitidas por alimentos o Trematodiasis de transmisión alimentaria (WHO, 2018).

Los trematodos causantes de estas enfermedades son más de 80 especies registradas que infectan a los humanos por medio de los alimentos (Fürst, 2012). Los distintos géneros y especies se encuentran presentes en diferentes fuentes alimenticias como: peces, crustáceos, moluscos, algas, plantas acuáticas entre otras; y afectan a diferentes órganos como: Hígado, pulmones, intestino, etc. Como se puede observar en la Tabla. 1 se clasifican los géneros y especies más importantes de trematodos, la fuente alimenticia en la que se encuentran y el órgano afectado.

Tabla 1.
Clasificación de los Trematodos por fuente de infección y órgano afectado.

Órganos afectados	Género	Especie	Fuente	Hospedador final
	<i>Clonorchis</i>	<i>C. sinensis</i>	Peces	Perros y otros carnívoros que consumen peces.
Hígado y vías biliares	<i>Opisthorchis</i>	<i>O. viverrini</i>	Peces	Gatos y otros carnívoros que consumen peces.
		<i>O. felineus</i>		
	<i>Amphimerus</i>	<i>Amphimerus</i> spp.	Peces	Gatos, perros, aves, ratones, tortugas, raposas, delfines.
Pulmones	<i>Paragonimus</i>	<i>Paragonimus</i> spp.	Cangrejos de río	Gatos, perros y carnívoros que comen crustáceos.
	<i>Fasciola</i>	<i>F. hepatica</i> <i>F. gigantica</i>	Vegetales acuáticos	Ovejas, ganado y otros herbívoros
Intestino	<i>Haplorchis</i>	<i>H. taichui</i> , <i>H. pumilio</i>	Peces	Pájaros y otros mamíferos que consumen peces.
	<i>Metagonimus</i>	<i>M. yokogawa</i>	Peces	consumen peces.

Tomado de: (Cevallos, 2018)

Más de 50 millones de personas se encuentran infectadas por trematodos hepáticos a nivel mundial. Los cuales pertenecen a los géneros *Clonorchis* y *Opisthorchis*, especialmente las especies *C. sinensis*, *O. viverrini* y *O. felineus* perjudicando a las poblaciones de Asia, especialmente en los países de la costa este como: Corea, Taiwán, China, Japón, entre otros (Zheng, 2016).

Las principales trematosis hepáticas son las causadas por los géneros *Clonorchis*, *Opisthorchis*, *Amphimerus* y *Fasciola*. También son conocidas

como Trematosis zoonóticas transmitidas por alimentos. Se estima que el 60% de las enfermedades humanas, y el 60-70% de las enfermedades emergentes son zoonóticas, por lo que son mucho más difíciles de controlar, prevenir y eliminar (Webster, 2016). Las Trematosis hepáticas llegan a infectar a los humanos por medio del consumo de peces crudos o mal cocidos, a esto se le conoce como ictiozoonosis, o en el caso de *Fasciola*, de vegetales crudos (Greter, 2017). Debido a que los peces son de gran importancia para el hombre por su alto valor alimenticio, los hace transmisores de varias enfermedades a gran escala (Pulido, 2015).

Por esta razón, son conocidas como zoonóticas, ya que el parásito es intercambiado entre los intermediarios de su ciclo, hasta el hospedero definitivo, y porque no solamente afecta a los humanos sino también a varios mamíferos, tanto domésticos como silvestres, que pueden iniciar el ciclo eliminando los huevos en fuentes de agua, hasta que estos infecten a los humanos u otros animales, y viceversa (Wit, 2017; Godfroid, 2017).

Las especies que afectan al hígado, causantes de las enfermedades ictiozoonóticas, son de gran importancia debido al daño que provocan, ya que se albergan y se desarrollan en los conductos biliares y se alimentan de los mismos fluidos (Sithithaworn, 2014). También es importante conocer la distribución geográfica, ya que se encuentran en gran parte de Asia y América del Sur, teniendo un mayor contacto con las comunidades, poblaciones y asentamientos, generalmente pobres y de bajos recursos, donde no tienen acceso al agua potable, falta de saneamiento, poca o nula atención médica, alojamiento inadecuado, etc. (Hotez, 2018).

2.4. Trematodiasis en el Ecuador

El Ecuador es un país tropical Latinoamericano, ubicado en la costa oeste de América del Sur. Es considerado uno de los países en vías de desarrollo, por lo que sus pobladores sufren de varias enfermedades endémicas (Valenzuela,

2018). Las zonas más afectadas son las que se encuentran excluidas de las grandes ciudades, como las zonas rurales habitadas especialmente por pobladores y comunidades pobres o de escasos recursos, donde el alojamiento es inadecuado, falta de atención médica, bajo o nulo acceso al agua potable y alcantarillado, falta de saneamiento, etc. (Hotez, 2014). Estos factores sumados con el clima cálido de las zonas tropicales y la humedad característica, provoca una proliferación a gran escala de patógenos (Bhattacharya, 2018) como bacterias, hongos, virus y parásitos; que se mantienen en constante contacto con los animales y los seres humanos residentes en estos asentamientos (Hotez, 2018).

Los animales y humanos que viven en estas zonas son víctimas de diversas enfermedades, por lo que cada individuo puede tener no solo una enfermedad sino varias (Feasey, 2010). Hasta el momento, estas enfermedades son consideradas como Enfermedades Tropicales Desatendidas, (NTD) por sus siglas en inglés. Estas anomalías pueden ser transmitidas por varios vectores como mosquitos, animales, plantas, alimentos etc. (Seyoum, 2015)

Las enfermedades que son transmitidas por animales o que pueden infectar tanto a animales como a seres humanos son conocidas como zoonóticas (Webster, 2016). Estas enfermedades son difíciles de prevenir, controlar y eliminar (Heeney, 2006). Las enfermedades zoonóticas también pueden ser transmitidas por alimentos, los casos más reconocidos en el Ecuador son las infecciones provocadas por trematodos, las cuales son transmitidas por alimentos mal cocidos como peces, cangrejos de agua dulce y plantas. Las infecciones causadas por trematodos son especialmente transmitidas por peces de agua dulce, estas enfermedades son conocidas como enfermedades ictiozoonóticas (Greter, 2017). Las trematosis transmitidas por alimentos más comunes en el Ecuador son: paragonimiasis pulmonar, fasciolosis hepática y amphimeriasis.

La paragonimiasis pulmonar es una enfermedad causada por trematodos del género *Paragonimus* (Bahr, 2017). La infección se contrae por medio de la ingestión de cangrejos de agua dulce crudos o mal cocidos que albergan metacercarias, faceta inmadura del parásito. Una vez ingeridas las metacercarias, estas se movilizan hacia los pulmones en donde se desarrollan (Amaro, 2016). Los síntomas que se pueden presentar son muy parecidos a los de la tuberculosis como tos con esputo sanguinolento, lo que provoca una grave confusión. Muchas veces el desarrollo de los trematodos jóvenes puede causar anomalías extrapulmonares en diferentes órganos como el cerebro (Amaro, 2016) y el hígado (Lin, 2018).

Otra enfermedad producida por trematodos en el Ecuador es la fasciolosis, la cual es causada por *Fasciola hepatica*. Este trematodo afecta por lo general a rumiantes domésticos, animales herbívoros, omnívoros, aves y al hombre. La fasciolosis se considera una de las enfermedades zoonóticas emergentes más importante, ya que se encuentra distribuida por más de 51 países a nivel mundial, colocando a más de 250 millones de ovinos y 300 millones de bovinos en riesgo de contraerla (Hernández, 2018). Esta trematosis llegó al continente americano por medio de la colonización desde Europa, y se estima de más de 17 millones de personas se encuentran infectadas a nivel mundial (Bargues, 2017). *F. hepatica* llega a infectar a una alta cantidad de seres vivos debido a que se encuentra en los pastos donde varias especies herbívoras como omnívoras pastan y llegan a contraer fasciolosis, llegando a provocar pérdidas económicas en cuanto a la producción de alimentos derivados de estos animales, como bajas en la producción de leche, pérdida de peso de los animales y disminución la fertilidad (Byrne, 2018).

Recientemente se ha descrito en el Ecuador una enfermedad emergente producida por el trematodo hepático *Amphimerus* spp., cual fue descrita por primera vez en el Ecuador en 2011 por (Calvopiña, 2011). Es considerada una enfermedad nueva zoonótica emergente que coloca en riesgo al 13% de la población asentada y a un sinnúmero de animales domésticos como perros y gatos (Calvopiña, 2015), a lo largo del Río Cayapas ubicado en la costa norte

del Ecuador (Cevallos, 2018). Los síntomas que genera este trematodo son similares a los del género *Clonorchis* y *Opisthorchis* de la familia Opisthorchiidae, por esta razón se creía que la *Amphimerus* spp. era una especie de *Opisthorchis*, *O. guayaquilensis* (Calvopiña, 2011). Los trematodos de esta familia generan daños en hígado ya que el parásito se alberga en este órgano, alimentándose de sales y fluidos biliares.

2.5. Amphimeriasis

La amphimeriasis, es una enfermedad producida por el trematodo hepático, *Amphimerus* spp., esta enfermedad es transmitida por la ingestión de peces crudos o insuficientemente cocidos de los ríos de las áreas endémicas (Cevallos, 2018). También es conocida por ser una enfermedad zoonótica, específicamente ictiozoonótica (Greter, 2017), ya que pasa por una variedad de intermediarios hasta llegar a su hospedero definitivo, los cuales son mamíferos tanto domésticos como silvestres y también el ser humano (Webster, 2016).

Los trematodos de vías biliares se albergan en el hígado de su hospedero, donde se alimenta de sales biliares (Sithithaworn, 2014). *Clonorchis* y *Opisthorchis* pueden llegar a provocar gran variedad de estragos en el hospedero como: colangiocarcinoma, hepatomegalia, colangitis, etc.(Calvopiña, 2011).

Sin embargo, a pesar de generar varios síntomas perjudiciales en la salud de las personas, son considerada como enfermedades tropicales desatendidas (NTD), ya que no mata de manera inmediata (WHO, 2010).

2.5.1. *Amphimerus* spp.

Amphimerus spp. es un helminto, platelminto, trematodo digeneo, parásito hepático ubicado en las vías biliares, perteneciente al grupo de los gusanos planos, dependientes de otro ser vivo para su desarrollo y subsistencia. Fue descubierto por Ward en 1901, en el hígado de un gato en Manitoba, Canadá

(Bowman, 2008), el gato se alimentaba de *Catostomus commersonii*, un pez endémico del lago Manitoba. Ward describió a este parásito como *Opisthorchis pseudofelineus*, posteriormente Barker en 1911, clasificó a esta nueva especie en el género *Amphimerus*, dentro de la familia *Opisthorchiidae* (Evans, 1963).

Posterior a su descubrimiento en Canadá, durante el último siglo se ha registrado su presencia en varios países a lo largo del continente americano, Canadá y Estados Unidos en América del Norte; México, Costa Rica y Panamá en América Central; Venezuela, Colombia, Ecuador, Brasil y Perú en América del Sur (THATCHER, 2011).

2.5.2. Clasificación taxonómica

El género *Amphimerus* pertenece al filo Platyhelminthes, al sub-filo Neodermata, a la clase Trematoda, subclase Digenea, al orden Opisthorchiida, a la familia Opisthorchiidae (Calvopiña, 2011) como lo indica la Figura 2.

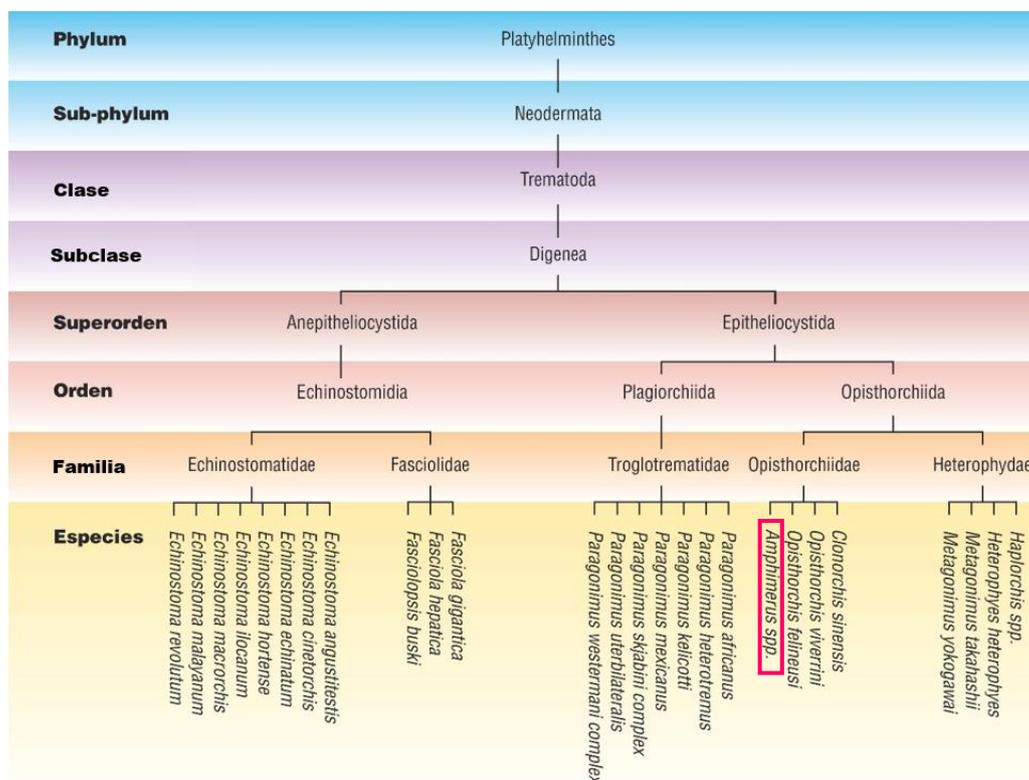


Figura 2. Clasificación taxonómica de *Amphimerus* spp.

Tomado de (Cevallos, 2018)

La taxonomía representada en esta figura, indica la estrecha relación que mantiene *Amphimerus* spp. con varias especies patógenas, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Las más conocidas son las especies pertenecientes a los géneros *Fasciola*, *Paragonimus*, *Clonorchis*, *Opisthorchis* (Zheng, 2016) y *Amphimerus*.

2.5.3. Morfología

Los huevos de *Amphimerus* tienen un tamaño de 28-33 μm x 12-15 μm , presentan una espina inferoposterior y un opérculo en su parte anterior. Por medio de la observación por microscopía electrónica, la superficie de los huevos de *Amphimerus* spp. es rugosa e irregular en forma de parches, a diferencia de *C. sinensis* que es fina, reticulada y regular, como se puede observar en la Figura. 3.

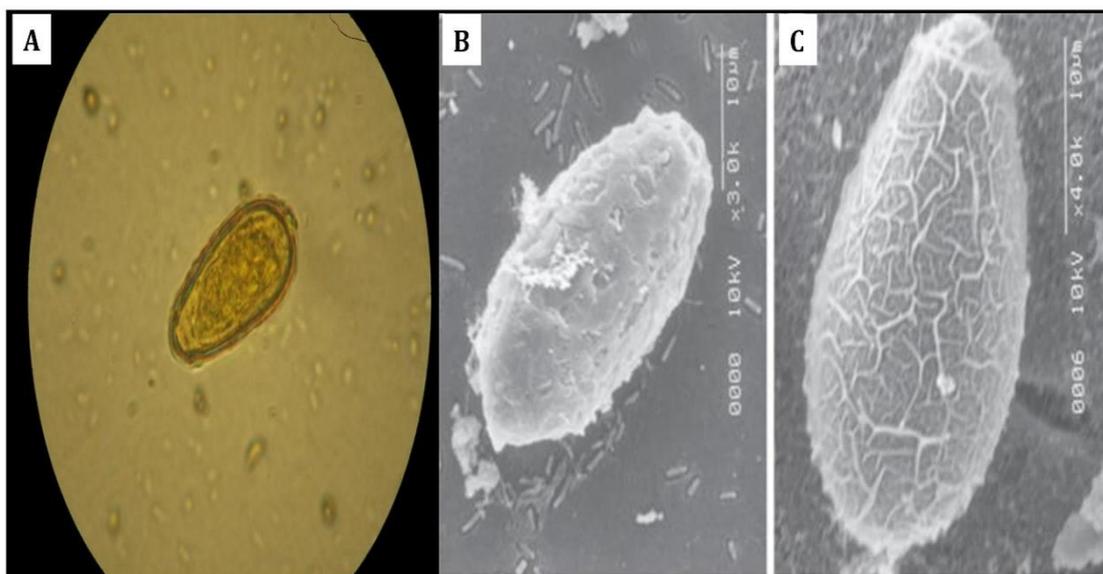


Figura 3. Imágenes de huevo de *Amphimerus* spp. y *Clonorchis sinensis*, microscopía óptica y electrónica.

Tomado de (Calvopiña, 2011).

- a. Huevo de *Amphimerus* spp. ecuatoriano
- b. Microscopía electrónica.
- c. Huevo de *C. sinensis* a microscopía electrónica.

El trematodo *Amphimerus* spp. es un parásito hepático hermafrodita, es decir que contiene los 2 sexos en el mismo organismo. Debido a que en su estado adulto se encuentran y se desarrollan en las vías biliares del hígado, estos contienen una morfología específica para movilizarse en los conductos biliares del cuerpo del hospedero, son aplanados y alargados en forma de hoja, lo cual les permite habitar en estas condiciones. Los *Amphimerus* adultos presentan una coloración rojo- rosada y miden entre 0,5-1,1 mm de ancho por 8-13,6 mm de largo (Calvopiña, 2011).

En la estructura de *Amphimerus* (Figura 4) se destacan las glándulas vitelinas, las cuales se encuentran distribuidas en cuatro grupos 2 anteriores y 2 posteriores, a diferencia de *Clonorchis* y *Opisthorchis* que existen solo en la zona frontal a los testículos; otra característica que diferencia a este género de los demás de la familia Opisthorchiidae es la ventosa ventral, que es mayor que la oral; también los testículos son redondeados o ligeramente lobulados (Calvopiña, 2011). Adicionalmente, *Clonorchis* tiene dos testículos grandes altamente ramificados y en *Opisthorchis* son siempre lobulados (Yamaguti, 1997; Bowman, 2002).

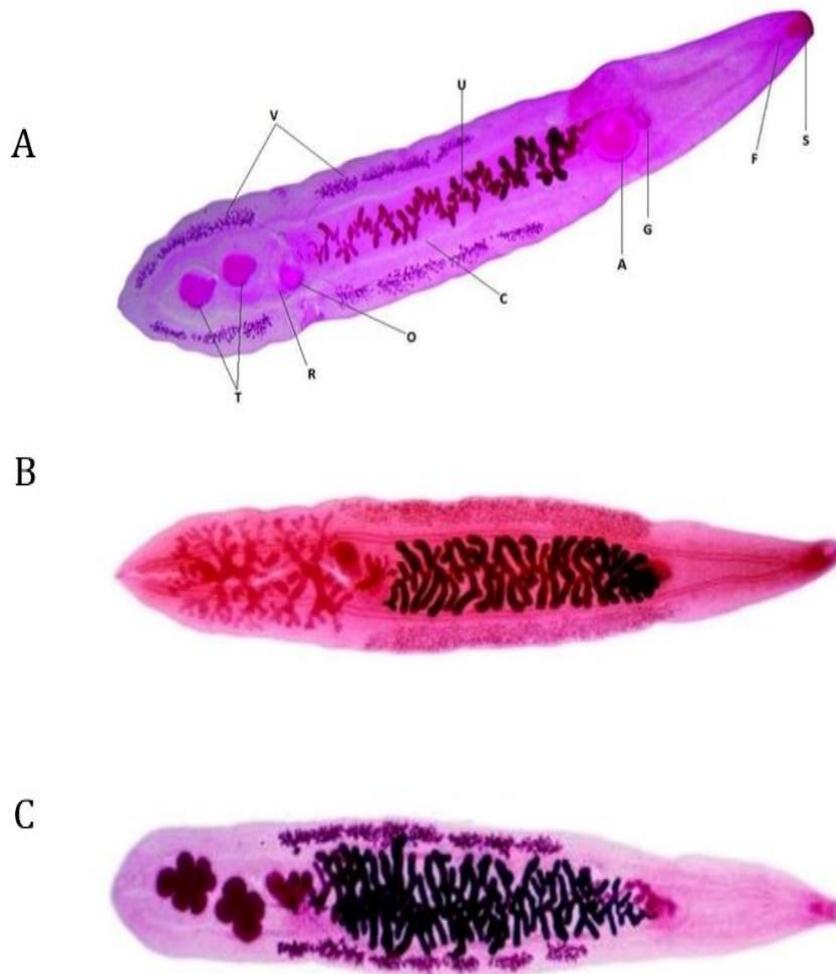


Figura 4. Diferencias morfológicas de los géneros de la familia Opisthorchiidae: Amphimerus spp, Clonorchis sinensis y Opisthorchis viverrini.

Tomado de (Cevallos, 2018)

- A. *Amphimerus* spp. adulto de Ecuador (corte ventral).
- a. Ventosa ventral, de mayor tamaño que la ventosa oral.
 - s. Ventosa oral.
 - g. Poro Genital, por delante de la ventosa ventral.
 - v. Glándulas vitelinas, se encuentran divididas en dos partes
 - t. Testículos redondeados.
 - r. Receptáculos seminal.
 - o. Ovario.
 - u. Útero.
 - c. Conducto vitelino.
 - f. Faringe.
- B. *Clonorchis sinensis*.
- C. *Opisthorchis viverrini*.

2.5.4. Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Amphimerus* spp. aún no está del todo conocido (Calvopiña , 2011). Sin embargo, por medio de investigaciones previas, se ha determinado que su ciclo vital comienza por medio de la producción de huevos embrionados (Figura 5), generados por el adulto, los cuales son eliminados o excretados por la materia fecal del hospedador definitivo. Estos llegan al agua dulce de lagos y ríos, donde los huevos son ingeridos o asimilados por caracoles, los cuales son los primeros intermediarios del ciclo. Dentro del caracol, el parásito pasa por 4 etapas de metamorfosis: miracidio, esporocito, reñas y finalmente cercarias, estas últimas contienen un flagelo que les permite movilizarse en el agua (Johansen, 2015; Keiser, 2005).

Según el estudio de Zemmer y colaboradores (2017), indica que los trematodos son ingeridos por los caracoles, ya que se han encontrado en el tracto digestivo, por medio de la disección del caracol de agua dulce, *Elimia proxima*, en los montes Apalaches en Carolina del Norte (Zemmer, 2017). Sin embargo, en el caso de *Amphimerus* spp. no se ha podido determinar si los trematodos son ingeridos o infectan de distinta manera a los caracoles. Una vez que las cercarias de *Amphimerus* son liberadas por los caracoles, penetran en de la piel de los peces, segundos intermediarios del ciclo biológico, se enquistan de manera que el parásito queda dentro de un tegumento o cápsula, formando una metacercaria dentro de las escamas y músculos del pez (Calvopiña, 2015, 2011).

El parásito produce infección en humanos y en animales tanto domésticos como silvestres a través de la ingestión de peces crudos o cocinados inadecuadamente (Johansson, 1972). Como es usual en el ciclo de vida de trematodos de la familia Opisthorchiidae, los peces son portadores de metacercarias activas, las cuales una vez ingeridas se separan del músculo de pescado en el estómago por la acción de los jugos gástricos. Las metacercarias avanzan hasta el duodeno, donde son liberadas por medio de proteasas como cisteína y tripsina. Posteriormente los trematodos liberados, se

trasladan a través de la ampolla de Vater en donde se dirigen a las vías biliares intrahepáticas, sitio en el cual se desarrolla el parásito adulto. Dentro del hígado el parásito se desarrolla en adulto en aproximadamente 2 meses, como es el caso de *O. viverrini* y *C. sinensis*. Este órgano le proporciona las condiciones favorables para su subsistencia, por lo que puede llegar a vivir hasta los 30 años y produciendo aproximadamente 4.000 huevos al día. (Attwood, 1978; Kim, 2009).

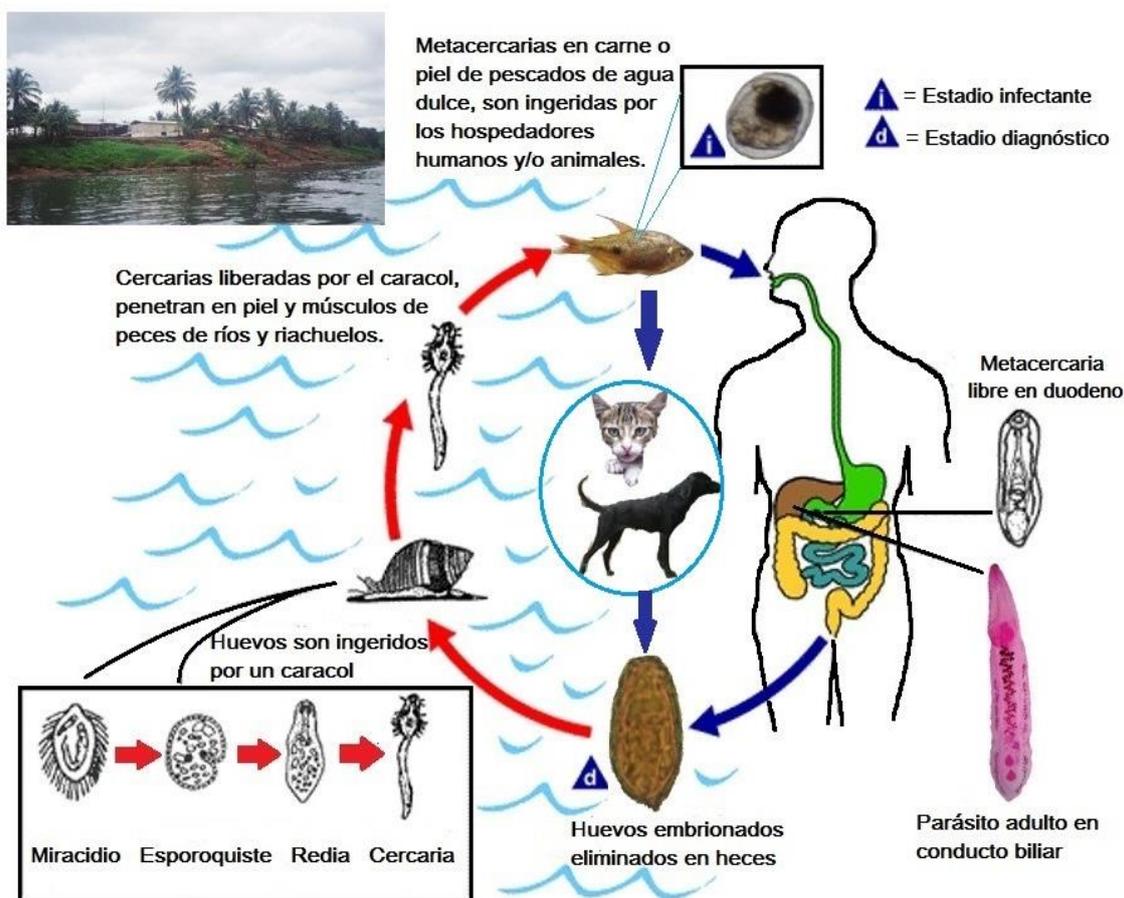


Figura 5. Ciclo vital del trematodo hepático, *Amphimerus* spp.

Tomado de (Cevallos, 2018)

2.5.5. Distribución Geográfica

La infección en humanos del trematodo *Amphimerus* spp., hasta el momento, solamente ha sido reportada en el Ecuador. Sin embargo, los reportes de la aparición de varias especies de *Amphimerus*, son de varios países a lo largo

del continente americano como se puede observar en la Figura 6, en los cuales existe el riesgo de infección o son zonas donde los humanos son infectados por este trematodo (Calvopiña, 2015), que aún no son reportadas. Varios informes han anunciado la aparición de huevos de la familia Opisthorchiidae, en heces humanas, en Perú y Colombia, los cuales son semejantes al género *Amphimerus* reportado en Ecuador. Lo que indica la importancia del estudio, no solo dentro de las fronteras ecuatorianas, sino también en los países vecinos y todo el continente americano (Calvopiña, 2011).

La presencia de *Amphimerus* spp. en Ecuador ha sido registrada por medio de microscopía en los estudios de Calvopiña y colaboradores, (2011), en la costa noroeste del país, cantón Eloy Alfaro provincia de Esmeraldas (Figura. 7). Las condiciones climáticas a las que se encuentra situado este parásito, son características de la zona tropical, con temperaturas de entre 24-28°C (Calvopiña, 2011; Cevallos, 2017) y una humedad relativa del 85%, esta zona forma parte del bosque lluvioso de “Chocó biogeográfico del Pacífico”, este se extiende por las costas de Panamá, Colombia y Ecuador. En este cantón existen 3 ríos: Río Santiago, Río Onzole y Río Cayapas, en los cuales habitan alrededor de 150 comunidades. En el mapa de la Figura 8 se puede observar las comunidades en las cuales se encontró la prevalencia de *Amphimerus* spp. en el año 2011 por M. Calvopiña y colaboradores. Los pobladores de estas zonas que se encuentran en las cercanías de estos ríos son mayoritariamente afroecuatorianos o indígenas Chachis, por lo que son los más afectados.

En la Figura 6, en conjunto con los datos recopilados en la Tabla 2, se indica la distribución geográfica del trematodo *Amphimerus* en América, en el cual describe a las 14 especies reportadas hasta el momento y los hospedadores en los cuales fueron halladas.

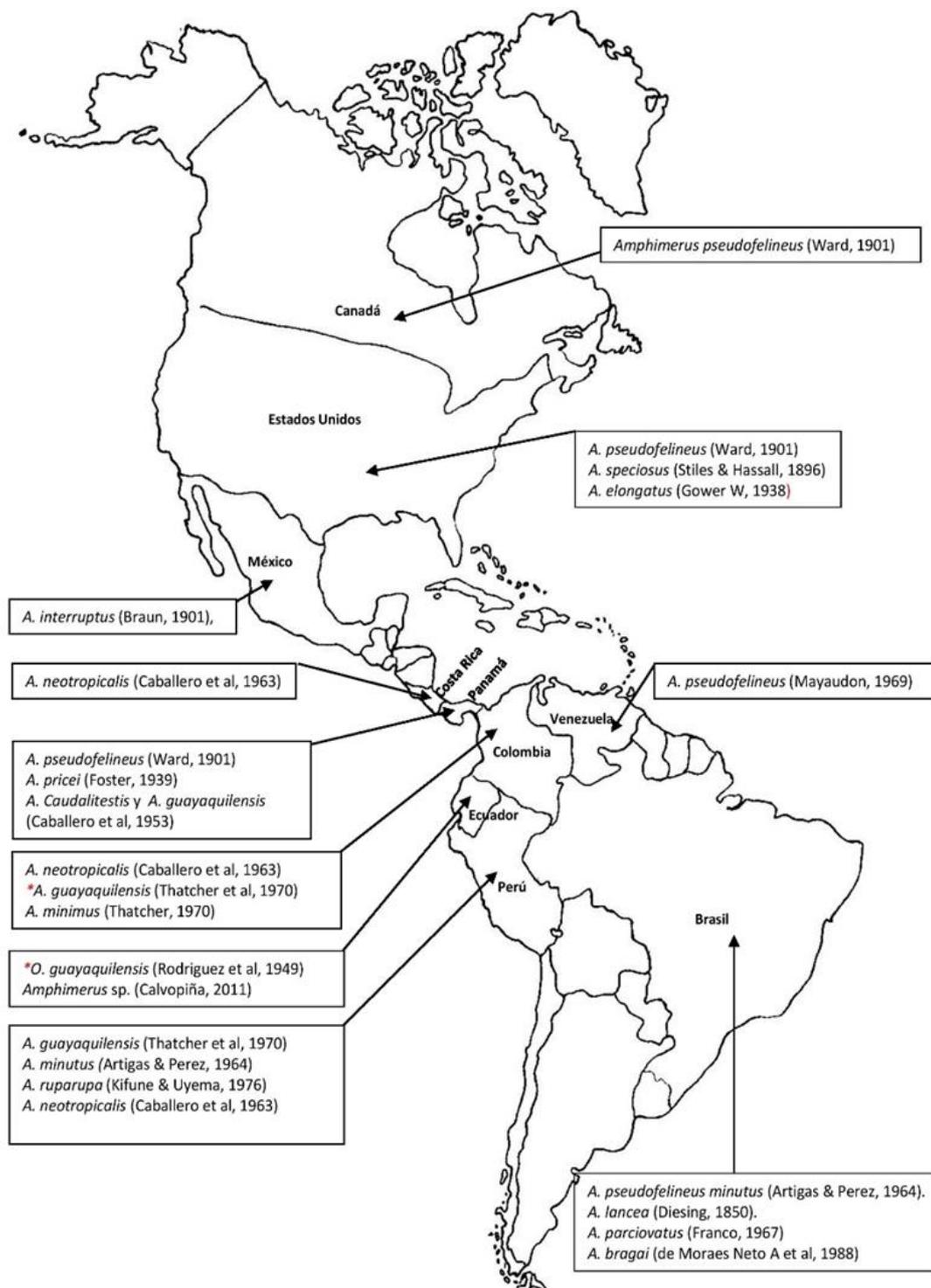


Figura 6. Mapa de la distribución geográfica del género *Amphimerus* spp.

Tomado de: (Cevallos, 2018)

Tabla 2.

Hospedador y País de registro de las especies del género Amphimerus.

Parásito	Hospedador	País (localidad)	Registro
A. pseudofelineus	No reportado	Canadá (Lago Minatoba)	Ward, 1901
	<i>Felis Felis (Catus) domesticus</i>	Estados Unidos de Norteamérica	Ward, 1901
	<i>Felis Felis (Catus) domesticus</i>	Venezuela (Maracay-Aragua)	Mayaudon, 1969
A. speciosus	No reportado	Estados Unidos de Norteamérica	Stiles & Hassall, 1896
A. pseudofelineus minutus	<i>Didelphis marsupialis</i> .	Brasil (Amazonía)	Artigas & Pérez, 1964
A. lancea	<i>Sotalia tucuxi</i> y <i>Nectomys squamipes</i>	Brasil (Amazonía, Goiás)	Diesing, 1850
A. parciovatus	<i>Didelphis marsupialis marsupialis L.</i>	Brasil (Belém do Pará)	Franco, 1967
A. bragai	<i>Nectomys squamipes</i>	Brasil (Minas Gerais)	de Moraes Neto A , 1988
A. minutus	<i>Didelphis marsupialis marsupialis</i>	Perú (Huánuco)	Artigas & Perez, 1964
A. ruparupa	<i>Philander opossum</i>	Perú (Huánuco y Loreto)	Kifune & Uyema, 1976
A. guayaquilensis	<i>Cannis familiaris</i>	Ecuador (P.P. Gómez)	Rodríguez , 1949
	<i>Philander Opossum L. & Didelphis marsupialis L.</i>	Colombia (Buenaventura, Valle y Antioquia) y Perú.	Thatcher V, 1970
	<i>Didelphis marsupialis & Felis Felis (Catus) domesticus</i>	Panamá (Colón)	Rodríguez , 1949
A. neotropicalis	<i>Philander Opossum L. & Didelphis marsupialis L.</i>	Colombia (Buga y Villa Carmelo, Valle)	Caballero , 1963
	<i>Philander opossum</i>	Costa Rica	Caballero , 1963
	<i>Didelphis peruguayensis</i>	Perú	Caballero , 1963
A. minimus	<i>Philander Opossum L.</i>	Colombia (Buga, Valle)	Thatcher, 1970
A. pricei	<i>Caluromys derbianus</i>	Panamá	Foster, 1939
A. caudalitestic	<i>Chironectes minimus</i>	Panamá	Caballero , 1953
A. interruptus	No reportada	México	Braun, 1901
A. elongatus	<i>Phalacrocorax auritus, birds.</i>	Estados Unidos (Louisiana y Michigan)	Pense & Childs, 1972
	<i>Ducks, swans</i>		Gower W, 1938
Amphimerus spp.	<i>Homo sapiens sapiens, Canis familiaris y Felis Felis (Catus domesticus)</i>	Ecuador (Río Cayapas-Esmeraldas)	Calvopiña , 2011

Tomado de (Cevallos, 2018)



Figura 7. Localización geográfica del cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas, zona costera del Ecuador.

Tomado de: (Cevallos, 2018)

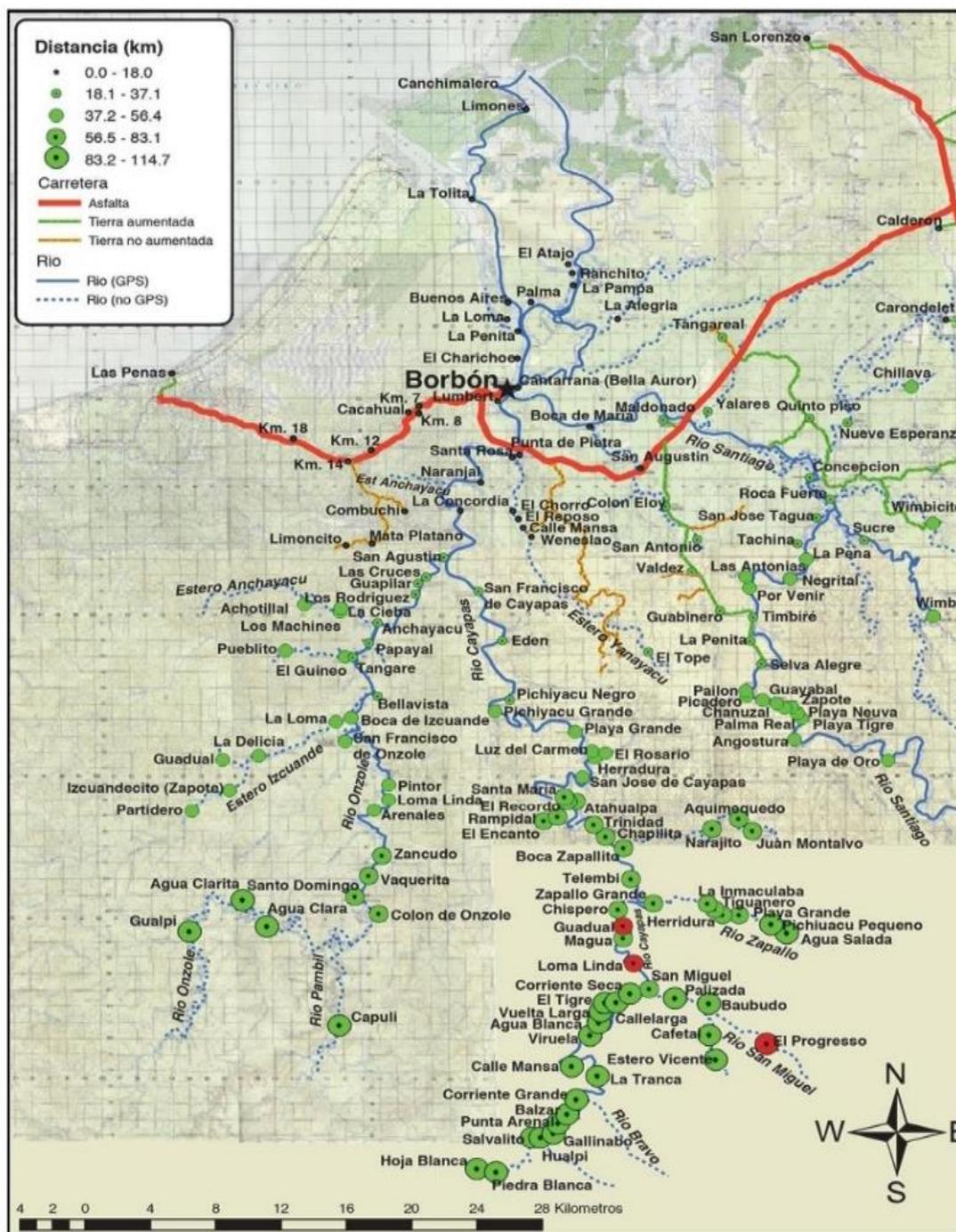


Figura 8. Comunidades en rojo, registro de presencia de *Amphimerus* spp. en la provincia de Esmeraldas.

Tomado de: (Cevallos, 2018)

2.6. Identificación de fuente alimentaria e incriminación de segundo huésped intermediario (peces).

Los residentes de las zonas endémicas donde *Amphimerus* spp. se encuentra, llegan a ser infectados por medio del consumo de peces crudos o inadecuadamente cocidos. Los pobladores de las cercanías del Río Cayapas, pertenecientes a las comunidades Chachis, mantienen tradiciones y culturas que involucran la pesca en el río, por lo que una de sus principales fuentes alimenticias son los animales acuáticos habitantes del Río Cayapas. Dentro de sus tradiciones se encuentran los platos típicos, donde los peces, previamente recolectados, son servidos ahumados, es decir colocan los peces que son de varias especies y de tamaño pequeño y medianos, sobre la fogata hasta el día siguiente y así son servidos en el desayuno (Calvopiña, 2011).

Esta serie de tradiciones han generado que las poblaciones, cercanas al Río Cayapas, sean infectadas por el trematodo hepático *Amphimerus* spp. Sin embargo, no todas las especies de peces residentes en el Río Cayapas son consideradas como segundos intermediarios de este parásito. Según Cevallos y colaboradores, (2018), existen 4 especies de peces de agua dulce que han sido identificadas como segundos intermediarios de *Amphimerus* spp. La identificación e incriminación de peces infectados con metacercarias de *Amphimerus* ha sido realizada por disección, digestión y observación microscópica de las metacercarias. Las especies de peces al momento involucradas como segundos huéspedes intermediarios son: *Andinoacara rivulatus* (familia *Cichlidae*), *Rhoadsia altipinna* (familia *Characidae*), *Bryconamericus buca*, y *Lebiasina aureoguttata* (familia *Piabucinae*) (Figura. 9) (Cevallos, 2018).

Para los trematodos *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis* de la misma familia Ophisthorchiidae, perteneciente el trematodo *Amphimerus*, varias investigaciones han sido realizadas para la incriminación de especies del segundo huésped intermediario. En las cuales involucran la captura de peces

de agua dulce de las zonas endémicas, realizar una disección de los tejidos blandos y posteriormente la visualización en el microscopio (Maleewong, 2003; Parvathi, 2008).

Sin embargo varias técnicas moleculares han sido desarrolladas para la identificación específica de los trematodos hallados y la posterior asociación de especies intermediarias, como lo indica Le y colaboradores, (2006), el desarrollo de la técnica molecular PCR Multiplex para *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis*, ayudarnos a la detección de estas especies diferenciándolas de otros trematodos encontrados en peces de las áreas endémicas de Vietnam, facilitando a la incriminación específica de peces intermediarios en el ciclo de estos trematodos (Le, 2006; Lin, 2018).

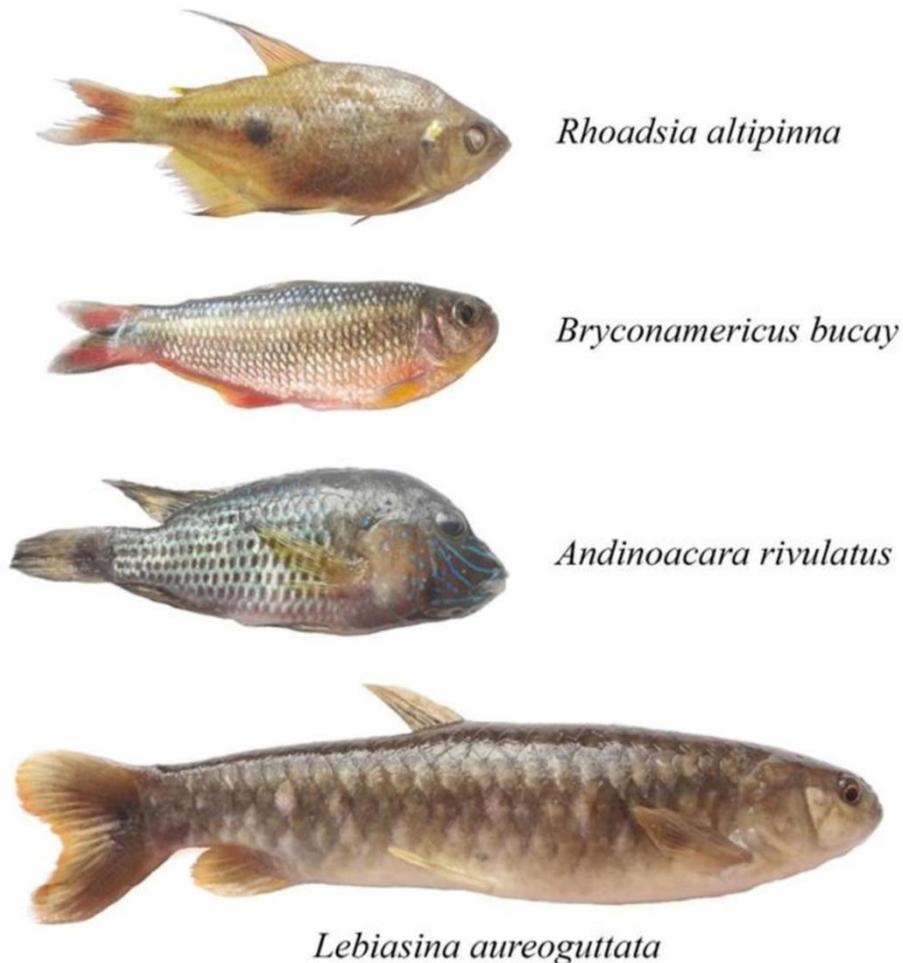


Figura 9. Segundos intermediarios de *Amphimerus* spp.

Tomado de: (Cevallos, 2018)

2.7. Técnicas de identificación de *Amphimerus* spp.

Existen varios métodos y técnicas para la identificación de trematodos de la familia Opisthorchiidae, como: Microscopía, técnicas inmunológicas y técnicas moleculares. Las cuales han sido utilizada para la detección de trematodos en tanto en seres humanos como intermediarios. Específicamente en *Amphimerus* spp. las técnicas desarrolladas son, microscopía: para la detección de huevos en heces humanas, presencia de metacercarias en huéspedes intermediarios secundarios (Calvopiña, 2011); técnicas inmunológicas: detección de anticuerpos en extracto crudo en suero de sangre humana (Cevallos, 2017); y técnicas moleculares para la identificación de huevos de *Amphimerus* spp. en heces humanas (Cevallos, 2018).

2.7.1. Microscopía

Para la detección de infecciones parasitarias por trematodos de la familia *Opisthorchiidae*, la microscopía ha sido el método de diagnóstico más utilizado, por medio de la visualización directa de huevos en heces en individuos infectados. Existen métodos coproparasitológicos que son utilizados junto a la microscopía para la obtención de resultados confiables, como sedimentación espontánea, concentración con formalina-éter y la técnica de Kato-Katz.

En el caso de *Amphimerus* spp. se utiliza la microscopía para la detección de huevos en heces humanas, según Calvopiña, (2011), con este método la prevalencia de *Amphimerus* spp. en las comunidades cercanas al Río Cayapas, provincia de Esmeraldas es del 34%. Los resultados de este estudio fueron obtenidos por medio de microscopía de heces humanas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen métodos coproparasitológicos que aumentan la eficiencia de esta técnica.

En el año 2018, Calvopiña y colaboradores, compararon varios métodos coproparasitológicos determinando y comparando su sensibilidad. Los métodos

fueron: examen en fresco, concentración con formalina-éter, sedimentación espontánea y la técnica de Kato-Katz; obteniendo una sensibilidad del 1%, 18%, 21% y 25,7% respectivamente (Cevallos, 2018).

Para la identificación de los estadios larvarios, de los trematodos de la familia Opisthorchiidae, en los organismos intermediarios es necesario la recolección de caracoles (primeros huéspedes intermediarios) y peces (segundos huéspedes intermediarios) de las áreas endémicas, disección, digestión artificial y visualización microscópica de las muestras. Varias investigaciones como Onsurathum (2016), Kim (2008) y Sukontason (1997) determinan la prevalencia de *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* y *Haplorchis taichui* en segundos intermediarios (peces), por medio de la recolección de peces de las áreas endémicas, disección de los tejidos blandos, digestión artificial y finalmente la observación microscópica de muestras (Kim, 2008; Onsurathum, 2016; Sukontason, 1997).

El estadio adulto de *Amphimerus* spp. y de varias especies de la familia Opisthorchiidae, se encuentra en las vías biliares del hígado de humanos y animales mamíferos tanto domésticos como salvajes. Para la obtención de parásitos adultos, según la investigación de Le y colaboradores, (2006), se requiere de un tratamiento previo de pacientes con praziquantel, el cual es un medicamento antihelmíntico que genera contracciones y daño del tegumento del parásito, provocando el desprendimiento y la muerte del parásito de los conductos biliares. Por el mecanismo de acción genera la parálisis y muerte del trematodo debido a la alteración en el flujo de iones de calcio, de esta manera el parásito puede ser excretado (Doenhoff, 2008).

Sin embargo, para la obtención de parásitos adultos vivos se requiere de la disección de hígados de organismo infectados. En el año 2015 Calvopiña y colaboradores, obtuvieron *Amphimerus* adultos por medio de la disección de hígados de perros y gatos infectados en las zonas endémicas con amphimeriasis en el Ecuador (Calvopiña, 2015).

Sin embargo, a pesar de que la microscopía de huevos ha sido comúnmente utilizada como método de diagnóstico, no es considerada una técnica altamente sensible, eficaz y específica, ya que existen varios factores que afectan estas características como la similitud que hay entre los huevos de los trematodos de la familia Opisthorchiidae, por lo que se generan confusiones entre géneros y especies de esta familia, afectando a su especificidad (Thatcher, 1911). La comprobación de especies en huevos se realizó por microscopía electrónica entre huevos de *Clonorchis sinensis* comparando con *Amphimerus*, encontrando que las estructuras externas eran completamente diferentes (Fig. 3) (Calvopiña, 2011).

Debido a la similitud en la morfología vista por la microscopía de luz, se requiere de personal calificado para la identificación y clasificación de los parásitos encontrados, además se requiere de métodos coproparasitológicos, mencionados anteriormente, que deben ser utilizados para un resultado más eficiente, provocando gasto de recursos y tiempo, lo que afecta a la eficacia de esta técnica. Finalmente; la toma de muestras, transporte, manipulación de muestras, pérdida de muestras, confusión de huevos parasitarios con residuos de materia fecal, etc. Puede afectar a la sensibilidad de la técnica y generar resultados falsos positivos o falsos negativos (Calvopiña M., comunicación personal).

2.7.2. Técnicas Inmunológicas

Dentro de las técnicas inmunológicas desarrolladas para la identificación de trematodos de vías biliares es el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA (por sus siglas en inglés). Estudios realizados tanto en *Opisthorchis viverrini* como en *Clonorchis sinensis*, indican que la infección por trematodos hepáticos aumenta los niveles de Inmunoglobulina G (IgG) en el cuerpo por lo que se utiliza el extracto crudo de suero de sangre para su detección por medio de esta técnica (Emelianov, 2016; Moon, 2018).

La técnica inmunológica ELISA fue desarrollada para *Amphimerus* spp. en el 2017, la infección de este trematodo produce que los niveles de Inmunoglobulina G (IgG) se eleven dentro del cuerpo. La técnica desarrollada por Cevallos y colaboradores, (2017), detecta el anticuerpo anti-*Amphimerus* IgG en extracto crudo de suero de sangre humana, generando un método de diagnóstico con una sensibilidad mayor a la de las técnicas de microscopía (Cevallos, 2017).

2.7.3. Técnicas Moleculares

Para la identificación de infección de *Amphimerus* spp. tanto en humanos como en animales, ya sean intermediarios u hospederos, se realiza por medio de microscopía mayoritariamente. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta técnica carece de sensibilidad, eficiencia y especificidad. Por lo que ha sido de vital importancia el desarrollo de nuevas técnicas que cuenten con una mayor especificidad, sensibilidad y eficacia.

La técnica molecular más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se ha convertido en una de las herramientas más importantes para la detección y diferenciación de especies (Byrne, 2018; Guevara, 2016). Actualmente la PCR ha sido desarrollada y utilizada para la detección y diferenciación de especies de trematodos de la familia Opisthorchiidae, como es el caso de *C. sinensis* y *O. viverrini*, entre otras, mostrando su alta especificidad y sensibilidad (Yan, 2015). Es necesario tomar en cuenta que la sensibilidad de la técnica obtenida puede depender del proceso de extracción de ácido nucleicos, ya que las muestras o los reactivos a usar en la extracción pueden contener inhibidores de la enzima Taq Polimerasa.

La técnica variante de la PCR, PCR isotérmica mediada por bucle (PCR LAMP), ha sido desarrollada para el trematodo *Amphimerus* spp., según Cevallos y colaboradores, (2017) y (2018), la PCR LAMP permite una amplificación del ADN altamente específica y rápida en condiciones

isotérmicas. Esta técnica fue utilizada para la detección de *Amphimerus* en muestras de heces humanas, obteniendo una sensibilidad del 79,17% y una especificidad del 65,98% parámetros mayores a las técnicas coproparasitológicas y de microscopía. En cuanto a la eficacia de la técnica (Cevallos, 2018) indica que la detección visual del resultado es por colorimetría y turbidez por lo que facilita su realización en campo, aplicable para su detección en distintas muestras tanto en humanos como en animales intermediarios y hospederos.

2.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular para la identificación de especies u organismos por medio de la obtención de un gran número de copias de una parte o fragmento de ADN (Costa, 2004). Fue desarrollada por Kary Mullis en 1983.

La técnica se basa en la función común de la enzima polimerasa para replicar las cadenas ADN en las células (Parvathi, 2008). Para realizar una PCR se requiere de una polimerasa termoestable debido a las altas temperaturas que requiere la reacción, una de las polimerasas más utilizadas es la Taq polimerasa, la cual fue obtenida del microorganismo *Thermus aquaticus* que se encuentra en los respiraderos volcánicos submarinos y se encuentra adaptado a altas temperaturas (Onsurathum, 2017; Onsurathum, 2016). Para el correcto funcionamiento de la polimerasa se requiere de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), ya que es un cofactor de la enzima. También se requiere de dNTP's o nucleótidos de los 4 tipos para la formación de las nuevas cadenas, se requiere de cebadores o iniciadores los cuales son secuencias simples de ADN complementarios de entre 18-25 pb, los cuales indican a la polimerasa en donde deben iniciar y terminar la amplificación. Se requiere de un buffer o solución tampón que mantenga el pH estable (Kaewkong, 2013; Kenneth, 2001).

Para el desarrollo de la reacción se requiere de un termociclador, el cual es un equipo que genera un gradiente de temperatura. La PCR pasa por tres etapas de temperaturas distintas: Denaturación, Hibridación y Extensión (Mullis, 2012). La denaturación requiere de una temperatura entre 93 a 95°C, debido a que la cadena doble de ADN se denatura a esta temperatura y rompe sus enlaces de hidrógeno formando horquillas o 2 cadenas simples de ADN. La segunda etapa, hibridación, se adhieren los cebadores a la cadena molde, la temperatura óptima para este proceso es de aproximadamente 5°C menos que la temperatura de Melting (T_m) de cada cebador (Maleewong, 2003; Varkonyi, 2007). La última etapa que corresponde a la de extensión, es la etapa en la cual la polimerasa forma la cadena complementaria de una cadena simple de ADN, de esta manera se obtienen 2 cadenas o 2 regiones de ADN idénticas (Pfaffl, 2002)

Existen algunas variantes de la PCR las cuales han tenido múltiples propósitos en diversas investigaciones, como: PCR Nested o anidada, PCR Multiplex o múltiple, PCR Digital, RT-PCR o PCR retrotranscriptasa, (qPCR) PCR cuantitativa o en tiempo real, (q RT-PCR) PCR en tiempo real retrotranscriptasa, etc. (Lamaningao, 2017). La variante de PCR a utilizar en este proyecto es la PCR en Tiempo Real para la detección de *Amphimerus* spp. en peces infectados en el Ecuador.

2.9. PCR en Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real es una variante de la PCR, utiliza el mismo principio de la PCR convencional o punto final con la diferencia que contiene un sistema de detección por medio de fluorescencia (Rahman, 2011). El amplificado resultante es medido al instante con ayuda de un termociclador que aparte de cambiar la temperatura rápidamente y mantenerla, detecta la fluorescencia por medio de un fluorómetro acoplado. El fluorómetro contiene 2 etapas: primero, excita las moléculas fluorescentes a una longitud de onda específica; segundo, detecta la onda emitida en cada ciclo de la PCR. Los reactivos utilizados para

la PCR en Tiempo Real son los mismos que la PCR convencional, con la diferencia que se requiere de un fluoróforo (Scientific, 2014). Para la detección fluorométrica existen 2 tipos de fluoróforos: afines al ADN, los cuales se adhieren al ADN y emiten fluorescencia, esta se incrementa exponencialmente debido al aumento de cadenas según se desarrolla la PCR; y sondas específicas que se hibridan a la cadena molde (Lamaningao, 2015).

Las sondas son un sistema de detección más específico ya que emiten fluorescencia al momento de la amplificación de cada cadena, las sondas mantienen un sistema denominado Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia o FRET (por sus siglas en inglés) (Scientific, 2014), el cual consiste en el uso de dos fluoróforos, reportero y un apagador o *quencher*, al encontrarse en la misma sonda, el apagador emite fluorescencia que impide que la fluorescencia del reportero sea detectada, al momento en que las 2 moléculas son separadas, la fluorescencia del reportero puede ser detectada, la separación de las moléculas se produce al momento de la amplificación de cada molécula de ADN (Schmittgen, 2008).

Existen tres tipos de sondas: a) Sondas de hibridación, se utiliza 2 sondas o cebadores en los cuales el forward se encuentra marcado con el fluoróforo reportero en el extremo 5', mientras que en el primer reverse se encuentra el *quencher* o apagador en el extremo 3', al producirse la amplificación el apagador deja de emitir fluorescencia y el reportero la emite (Costa, 2004). b) Sonda de horquilla, mantiene los 2 fluoróforos en la misma sonda, el reportero en el extremo 5' y el *quencher* en el extremo 3', la estructura inicial de esta sonda se mantiene en horquilla donde los 2 fluoróforos se encuentran juntos o en contacto, al hibridarse a la secuencia de la cadena molde este se extiende y los fluoróforos se separan dejando emitir la fluorescencia del reportero. Finalmente, c) Sondas de hidrólisis, es un oligonucleótido específico de aproximadamente 20 pares de bases, los fluoróforos se encuentran añadidos en los extremos (reportero 5' y *quencher* 3'), en este tipo de sondas se encuentran las sondas TaqMan®, las cuales se hibridan a la cadena molde y el

quencher controla la fluorescencia del reportero, al producirse la amplificación el reportero se separa de la sonda y emite fluorescencia. Los fluoróforos más utilizados son NED, VIC y FAM mientras que las moléculas *quencher* son BHQ, DABCYL y TAMRA (Pfaffl, 2001).

Para la detección y análisis de datos la PCR en Tiempo Real requiere de un software específico, en el cual se observe el incremento de la Fluorescencia relativa en función de los ciclos, la fluorescencia relativa es directamente proporcional al aumento de cadenas de ADN en la reacción (Schmittgen, 2008). También debe indicar la curva de calibrado de la reacción con el ADN standard y los parámetros obtenidos de pendiente, intercepto en Y, coeficiente de correlación y el porcentaje de eficiencia (Pfaffl, 2001). Los datos y curvas resultantes obtenidas de la reacción indican varios parámetros a tomar en cuenta:

- Línea base: indica el nivel de señal de fluorescencia que se emite o se detecta en los 15 primeros ciclos, la señal emitida que se encuentra por debajo de la línea base se le denomina ruido (Pfaffl, 2001), ya que no mantiene un nivel de fluorescencia constante, sino que es irregular. La línea base debe ser determinada cuidadosamente en la superficie del ruido para eliminar el fondo emitido en los primeros ciclos, ya que a partir de la línea base se determina el ciclo de umbral (Ct).
- Umbral: El umbral o Threshold es el nivel en el cual el aumento de fluorescencia emitida es estadísticamente significativo sobre la línea base determinada. El umbral es establecido en la fase exponencial de la reacción (Dorak, 2007).
- Ciclo de umbral: el ciclo de umbral o Threshold cycle (Ct o Cq) es el número de ciclo de cada reacción al momento que cruza el umbral, este es utilizado para calcular la cantidad de ADN inicial (Schmittgen, 2008). El Ct es indirectamente proporcional a la cantidad de ADN inicial por lo que las muestras con mayor cantidad de ADN contienen un menor Ct.

- Curva standard: Para la realización de una curva standard en qPCR se requiere de la amplificación de diluciones seriadas de concentraciones conocidas para determinar la cantidad inicial de una muestra o identificar la eficiencia de la reacción (Livak, 2008). A partir de esta curva se puede determinar varios parámetros para la identificación del desarrollo de la reacción, los cuales son: intercepto en Y, pendiente, eficiencia y coeficiente de correlación (Schmittgen, 2008).
 - El intercepto en Y indica el valor de Ct cuando la cantidad más baja de copias de la cadena molde indica una amplificación estadísticamente significativa.
 - La pendiente debe mantenerse cercano a un valor de -3.32 la cual equivale a una eficiencia del 100%. Sin embargo, el rango aceptable de la pendiente se encuentra entre -3,58 y -3,10 (Pfaffl, 2001).
 - La eficiencia de la reacción indica si los resultados son reproducibles y precisos, debe encontrarse cercana al 100% ya que indica que el ADN se duplica después de cada ciclo (Schmittgen, 2008). Los factores que pueden influir en la eficiencia son las estructuras secundarias de la cadena molde, longitud del amplicón, contenido de GC, concentraciones de reactivos no óptimas, calidad de la enzima, entre otras pueden afectar a la eficiencia y generar un valor por debajo del 90%, si se obtiene una eficiencia mayor al 110% puede indicar la presencia de inhibidores de la PCR. El valor de la eficiencia es dependiente de la pendiente (Livak, 2008).
 - El Coeficiente de Correlación indica la linealidad de la curva standard (R^2) el cual es ideal cuando muestra un valor de 1, sin embargo, generalmente se obtiene un valor de 0,999 o cercano a 1.

Varias investigaciones utilizan la PCR en tiempo real para distintos propósitos, por lo que existe 2 tipos de qPCR: relativa y absoluta (Livak, 2008).

- Relativa: compara el cambio en la fluorescencia del estado basal de un gen de interés con el mismo gen de expresión constante o control, este es utilizado para ensayos de expresión génica (Livak, 2008).
- Absoluta: se utiliza para determinar la cantidad de ADN inicial en muestras de concentración desconocida, por medio de la formación de una curva de calibrado con diluciones en serie de un ADN standard de concentraciones y cantidades conocidas (Pfaffl, 2001).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diseño del plan experimental se encuentra especificado en el siguiente diagrama de flujo:

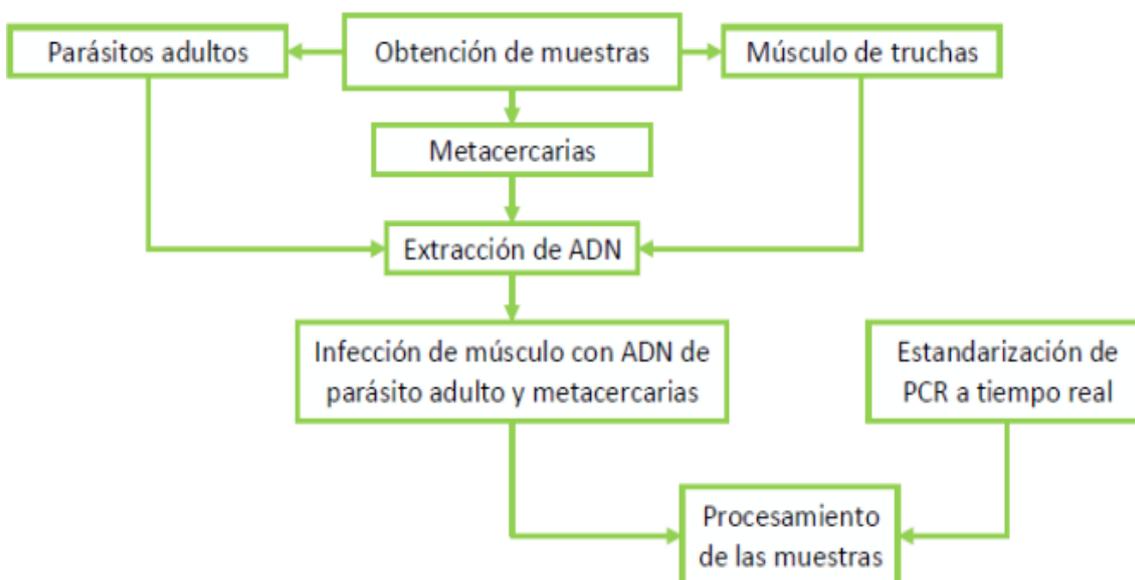


Figura 10. Plan Experimental

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Obtención de metacercarias (estadio larvario) y parásitos adultos de *Amphimerus* spp.

4.1.1. Obtención de Metacercarias de *Amphimerus* spp.

Las metacercarias de *Amphimerus* spp. se encuentran en los laboratorios de la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas (UDLA), a cargo del Dr. Manuel Calvopiña Hinojosa. Estas fueron obtenidas en investigaciones anteriores, en las cuales se participó activamente.

El estadio larvario de metacercarias de *Amphimerus* spp. se encuentra en el segundo intermediario de su ciclo, por lo que peces de las áreas endémicas de las cercanías del Río Cayapas fueron comprados a los pobladores de las zonas endémicas, catalogados y clasificados. Se realizó un lavado y posteriormente disección de cada uno, separándolos en 4 partes: vísceras, aletas, escamas y músculo. Cada una de sus partes fue digerida artificialmente con HCl al 1,5% y pepsina al 0,25%, mediante agitación magnética y a una temperatura de 40°C, hasta observar una mezcla homogénea.

Cada mezcla de digestión fue filtrada por una serie de tamices graduados de 500 µm y 300 µm, para la retención y posterior eliminación de sólidos de mayor tamaño, el líquido filtrado se pasó por un tercer tamiz de 106 µm y se eliminó el líquido filtrado, el sedimento resultante en el tamiz fue conservado y colocado en un vaso de precipitación. Se esperó que los sólidos retenidos previamente precipiten al fondo para eliminar el exceso de líquido y se colocaron en tubos de 15ml, los cuales fueron centrifugados durante 1 minuto a 8000 rpm, se eliminó el exceso de líquido y el sedimento fue trasladado a un tubo de 1,5 ml y refrigerado a 4°C.

Posteriormente, las metacercarias fueron separadas por medio de microscopía, se utilizó un estereomicroscopio, cajas Petri, pipetas de 1000 µl y 10 µl. Se

mezcló el contenido por pipeteo (pipeta de 1000 µl) de cada tubo resultante de la digestión artificial y se vertió en la caja Petri y se observó cuidadosamente, las metacercarias encontradas fueron recolectadas por medio de pipetas de 10 µl y colocadas en tubos de 1,5 ml. En total se separó 18 metacercarias, 10 en un tubo de 1,5 ml y 8 cada una en un tubo distinto.

4.1.2. Obtención de parásitos adultos de *Amphimerus* spp.

Los parásitos adultos fueron obtenidos del Banco de Muestras del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, Los cuales fueron obtenidos previamente durante el proyecto “*High Prevalence of the Liver Fluke Amphimerus sp. in Domestic Cats and Dogs in an Area for Human Amphimeriasis in Ecuador*” (Calvopiña, 2015) aprobado por el Comité de Ética del Centro de Biomedicina y realizado en la Universidad Central del Ecuador. El estado adulto de *Amphimerus* spp. se lo puede encontrar en vías biliares de hígados de mamíferos como perros, gatos y humanos. Los parásitos adultos se obtuvieron en las heces de personas adultas infectadas posterior a la administración de praziquantel, como se especifica en Calvopiña y colaboradores, (2011).

4.2. Obtención de tejidos blandos de peces e infección.

4.2.1. Obtención y procesamiento de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

La Trucha Arcoíris es un pez de agua dulce habitante de lagos y ríos del sector Andino de la región sierra. En estas zonas las condiciones climáticas son distintas a las de la zona costera tropical, las cuales son favorables para el desarrollo de *Amphimerus* spp., por lo que en la zona Andina no hay reportes de la incidencia de este trematodo y teóricamente los trematodos de la familia Opisthorchiidae no sobreviven en aguas frías. Por esta razón se escogió un pez, habitante de esta zona, como *Oncorhynchus mykiss* o Trucha Arcoíris,

para el análisis de muestras, ya que su músculo y tejidos blandos son libres de *Amphimerus* spp. por lo que fueron propicios a usarse como control negativo y músculo de infección para su análisis, evitando posibles contaminaciones con este trematodo. La trucha arcoíris fue obtenida del mercado local de Quito en la sierra ecuatoriana. El músculo fue cortado en partes de 5mm x 5mm x 20mm, cada parte fue colocada en criotubos de 2 mL y sumergidos en etanol absoluto, los tejidos fueron guardados a -20 °C. Después de 48 h de su almacenamiento, se reemplazó el etanol.

4.2.2. Infección de músculo de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con metacercarias de *Amphimerus*.

Para la infección del músculo de trucha se cortó con un bisturí estéril en partes con pesos de 50mg, 10mg, 5mg y 1mg (medidos en balanza), los mismos se colocaron en tubos de 1,5 ml. Las porciones de músculo fueron infectadas con una metacercaria o 1µl de ADN de *Amphimerus*, como lo muestra la Tabla. 3

Tabla 3.
Muestras e infección

Muestra	Músculo de Trucha (mg)			
Metacercaria	50 mg + 1 met	10 mg + 1 met	5 mg + 1 met	1 mg + 1 met
ADN <i>Amphimerus</i> spp. (µl)	50 mg + 1 µl AA	10 mg + 1 µl AA	5 mg + 1 µl AA	1 mg + 1 µl AA
Control Negativo	50 mg	10 mg	5 mg	1 mg

Nota: músculo de trucha en miligramos (mg), Metacercarias (1 parásito), ADN de *Amphimerus* spp. (AA) en microlitros (µl).

Las metacercarias fueron añadidas antes de la extracción de ADN para su extracción conjunta, y posteriormente para identificar si por medio de la técnica de PCR en Tiempo Real se puede detectar la presencia de mínimo una metacercaria en músculo de pez infectado.

Mientras que la infección con ADN de *Amphimerus* spp. fue realizada posterior a la extracción de ADN, para identificar si la cantidad de músculo afecta a la técnica molecular. El proceso de la Tabla. 3 se realizó por duplicado.

4.3. Extracción de ADN de metacercarias y de parásito adulto.

4.3.1. Extracción de ADN de metacercarias (estadio larvario) de *Amphimerus* spp.

La extracción de ADN de metacercarias de *Amphimerus* se realizó por medio de la resina iónica de chelex al 10%, representados en los siguientes pasos:

- 1) En un tubo de 1,5 ml se colocó 10 metacercarias, separadas anteriormente, se añadió 100 µl de Chelex-100(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.) al 10%, se agitó la solución de chelex previo al uso, debido a que la resina se precipita constantemente
- 2) Se homogenizó la muestra por medio de vortex (Ficher Scientific, EEUU) durante 2 minutos
- 3) Luego, se centrifugó (centrífuga: Eppendorf, Alemania) a 10 000 rpm por 1 minuto.
- 4) Después, se añadió 10 µl de proteinasa K (Promega Cop., Madison, Wis.).
- 5) Se Homogenizó por medio de vortex (Ficher Scientific, EEUU) durante 15 segundos.
- 6) Se procedió a incubar a 56°C en baño María (Memmert, Alemania) por 1 hora.
- 7) Luego se realizó un vortex (Ficher Scientific, EEUU) por 15 segundos.
- 8) Se incubó por segunda vez a 95 °C en Termobloque (Eppendorf, Alemania) durante 30 minutos.
- 9) Luego se centrifugó (centrífuga: Eppendorf, Alemania) a 8000 rpm por 30 segundos.
- 10) Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml, los mismos se almacenaron a -20°C. (Lamballerie, 1992; Suenaga, 2005).

4.3.2. Extracción de ADN del parásito adulto de *Amphimerus*

Para la extracción de ADN de *Amphimerus* adulto, se cortó un tercio del trematodo y se colocó en un tubo de 1,5 ml, dentro del mismo se cortó en partes pequeñas y luego se utilizó un pistilo para su trituración. La extracción de ADN se realizó por medio de la técnica de Chelex, como se indica en los siguientes pasos:

- 1) Se colocó 100 µl de Chelex-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.) al 10%.
- 2) Posteriormente se homogenizó por medio de vortex (Ficher Scientific, EEUU) durante 2 minutos.
- 3) Se centrifugó (centrífuga: Eppendorf, Alemania) a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- 4) Luego se incubó en baño María (Mammert, Alemania) a una temperatura de 56°C durante 1 hora.
- 5) Después se homogenizó por medio de vortex (Ficher Scientific, EEUU) durante 15 segundos.
- 6) Posteriormente la muestra se colocó en un termobloque (Eppendorf, Alemania) para su segunda incubación de 30 minutos a 95°C, ya que a esta temperatura actúa la Proteinasa K.
- 7) Finalmente, se centrifugó (centrífuga: Eppendorf, Alemania) la muestra a 8000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante resultante de la centrifugación se colocó en un tubo de 1,5 ml y fue almacenado a -20°C. (Suenaga, 2005).

4.3.3. Extracción de ADN de músculo de trucha infectado con metacercarias, ADN *Amphimerus* spp. y control negativo

La extracción de ácidos nucleicos de muestras de peces infectados con *Amphimerus* spp. se realizó por la técnica de chelex. La extracción se realizó en 24 tubos con los 4 pesos de músculo, como lo indica la Tabla. 3

respectivamente. El proceso fue realizado por duplicado. Se realizaron unos pasos previos a la extracción, detallados a continuación:

- 1) Se cortó en partes por medio de una tijera estéril.
- 2) Luego se utilizó un pistilo para triturar el músculo.
- 3) En cada peso de músculo se añadió una metacercaria.
- 4) Posteriormente se realizó la extracción con Chelex (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.) al 10%, con el protocolo previamente descrito en los apartados anteriores, con la diferencia de la adición de distintas cantidades de chelex al 10%. Se añadió 100 µl al peso de 1 mg de músculo, 150 µl a 5 mg, 200 µl a 10 mg y 250 µl a 50 mg.

4.4. Diseño de Cebadores

Los cebadores se diseñaron para la identificación de la región *ITS2* de *Amphimerus* spp. (AB678442) de 459 pares de bases, el primer forward (*AITS2F-213*) de 20 pb y el primer reverse (*AITS2R-418*) de 20 pb, como lo indica la Tabla. 4. El alineamiento (Figura.11) de las secuencias se realizó en el programa bioinformático Geneious (<https://www.geneious.com/>), el amplicón resultante es de 206 pares de bases. También se realizó el diseño de la sonda TaqMan AmphiProbe, secuencia descrita en la Tabla. 4, la cual fue ligada al fluoróforo FAM (extremo 5') y el *quencher* BHQ1 (extremo 3').

Tabla 4.
Cebadores utilizados en el proyecto y sonda fluorogénica (fluoróforo FAM)

	Cebador	Nombre	Secuencia	Bases
Cebadores	Forward	<i>AITS2F-213</i>	5'-TCTATGGCTTTTCCCCAATG-3'	20 pb
	Reverse	<i>AITS2R-418</i>	5'-CGAGGTCAGGAAAGTTGAGC-3'	20 pb
Taq Man	Sonda	AmphiProbe	5'- FAM -	25 pb
			TGTTGTGACTATGCGCGCTCCGTTA- BHQ1-3'	

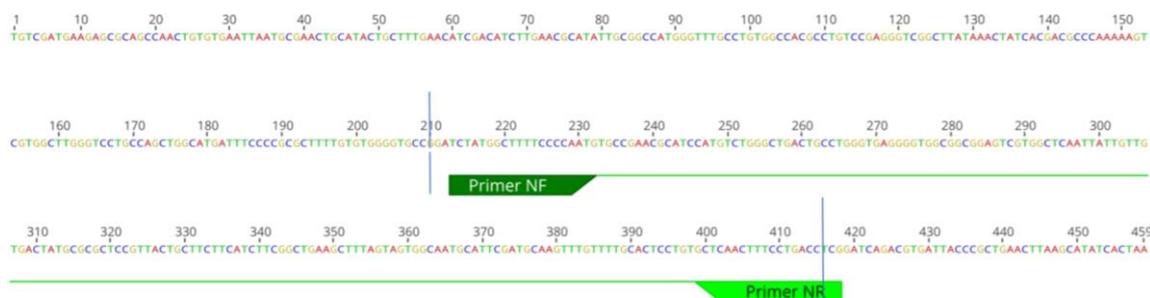


Figura 11. Alineamiento de cebadores a la región ITS 2.

El diseño de los cebadores forward y reverse como de la sonda TaqMan Amphiprobe, se realizó en la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas (UDLA), por el Investigador Germán Burgos.

4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

La técnica molecular de PCR en Tiempo Real se realizó por medio del kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega, el cual provee de 4 ml de Master Mix que contiene dNTP's, enzima Polimerasa (*Hot Start Polimerase*), Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y Buffer de reacción. El gen que se utilizó para la amplificación y detección de ADN de *Amphimerus* spp. fue el *ITS2* (AB678442) de 459 pares de bases, del cual se sintetizó (GenBlock) previamente para su uso como control positivo y standard. Los cebadores utilizados para identificar la amplificación positiva de la región *ITS2* de *Amphimerus* spp. fueron: *AITS2F-213* y *AITS2R-418* (diseñados para este proyecto por el Investigador Germán Burgos, de la Dirección General de Investigación, UDLA), también se utilizó una sonda fluorogénica, marcada con el fluoróforo FAM (diseñada por el mismo investigador), como lo indica la Tabla. 4.

Los materiales que se utilizaron para el proceso de la PCR en Tiempo Real fueron: Tubos blancos strips Bio Rad®; tapas transparentes (ultraclear Bio Rad®); puntas con filtro de 200 µl, 20 µl y 10 µl; pipetas automáticas de 200 µl, 20 µl y 10 µl y tubos de 0,5 ml. La técnica se realizó en el termociclador de PCR en Tiempo Real (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System BioRad)

En los laboratorios del Centro de Investigación de la Universidad de las Américas. Los resultados se visualizaron en el software del equipo.

El protocolo base utilizado, tanto para el Master Mix como para el Termociclador, fue el indicado por el kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega Technical Manual (Promega, 2018), como lo indica la Tabla. 5 a continuación. El cual indica la adición de 5 µl en un tubo de 0,5 ml a una concentración final de 1X; los cebadores forward y reverse se colocaron a una concentración de 0,9 µM con un volumen de 0,9 µl; la sonda TaqMan fue añadida con un volumen de 0,25 µl a una concentración de 0,25 µM; se colocó 0,95 µl de agua grado PCR a la reacción y finalmente se añadió 2 µl de ADN dando un total de 10 µl en la reacción final.

Tabla 5.

Protocolo base GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega

Compuesto	C1	C2	1Rx
<i>Go Taq MMx</i>	2x	1x	5 µl
<i>Primer F</i>	10 µM	0,9 µM	0,9 µl
<i>Primer R</i>	10 µM	0,9 µM	0,9 µl
<i>Sonda</i>	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
<i>H2O</i>			0,95 µl
<i>DNA</i>			2 µl
		Total	10 µl

Tomado de (Promega, 2018)

Nota: (C1) Concentración inicial, (C2) Concentración final, (1Rx) 1 Reacción, (µM) micro Molar, (µl) microlitro.

El protocolo base del termociclador utilizado (Tabla 6) involucra 3 etapas: Denaturación primaria, denaturación e hibridación. La etapa de Denaturación primaria consta de un ciclo al comienzo de la reacción a 95°C durante 2 minutos, en el cual la Polimerasa se reactiva y se puede comenzar la reacción. La siguiente parte de la reacción consta de 2 etapas, denaturación e hibridación, las cuales fueron repetidas durante 45 ciclos, la etapa de Denaturación involucra una temperatura de 93°C por 15 segundos, mientras que la de Hibridación a 50 °C durante 1 minuto.

Tabla 6.
Protocolo base del termociclador

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	2 min
45	93	15 seg
	50	1 min

Tomado de (Promega, 2018)

Nota: (°C) Grados Centígrados, (min) minutos, (seg) segundos.

Para la estandarización de la técnica se probó distintas temperaturas de Hibridación, gradiente de temperatura de Denaturación y distintas concentraciones de cebadores (Tabla. 7). Las condiciones más favorables serán utilizadas para la prueba en muestras, como fue indicado en la (Tabla. 3), para la identificación de metacercarias, su sensibilidad y especificidad. El ADN utilizado para la estandarización de la técnica fue el ADN sintetizado o GenBlock, del cual se realizaron 10 diluciones seriadas tomando en cuenta al stock como 10^{10} .

Tabla 7.
Gradiente de temperatura de Hibridación en grados Centígrados.

Tipo de Gradiente	Unidades	Rango
<i>Temperatura de hibridación</i>	°C	54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66
<i>Temperatura de denaturación</i>	°C	93 y 95
<i>Concentración de primers</i>	µM	0,2; 0,5 y 0,9

4.5.1. Experimento 1: Gradiente de temperatura de hibridación

El protocolo base indica una temperatura de hibridación de 60°C como óptima para el desarrollo de una PCR en Tiempo Real. Sin embargo, se estableció un rango (Tabla 7) para determinar la temperatura de hibridación óptima para la amplificación de ADN de *Amphimerus* spp. Se utilizó la segunda dilución seriada del GenBlock (10^8). Para la identificación de la temperatura óptima de

hibridación se realizó en 2 rangos, temperaturas menores a 60°C (rango 1) y temperaturas mayores a 60°C (rango 2). Se realizó la repetición de las temperaturas 60 y 62 °C.

4.5.2. Experimento 2: Gradiente de temperatura de denaturación

Se realizó una qPCR con el ADN standard de (10^8) con el Protocolo base GoTaq Probe y se probó entre dos tipos de temperatura de Denaturación (93 °C y 95 °C) como lo indica la Tabla. 7 para la identificación de la temperatura óptima.

4.5.3. Experimento 3: Gradiente de concentración de cebadores

Previo a la estandarización del protocolo del termociclador, se realizó una variante en la concentración de cebadores en los reactivos a utilizar para el desarrollo de la qPCR. El protocolo GoTaq Probe de Promega, indica que la concentración final de cebadores debe mantenerse entre 0,2 y 0,9 μM . Sin embargo, varios estudios indican que la concentración óptima de cebadores es de 0,2 μM (Cai, 2014; Rahman, 2011). Se experimentó con gradientes de concentración de 0,2 μM , 0,5 μM y 0,9 μM por duplicado de cada concentración.

4.5.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa informático SPSS. Se realizó una prueba ANOVA para determinar las diferencias significativas entre cada experimento. Posteriormente, se realizó una prueba Tuckey para la comparación del gradiente de denaturación vs. Gradiente de hibridación, Gradiente de denaturación vs, gradiente de cebadores y finalmente gradiente de cebadores vs. Gradiente de hibridación.

4.5.5. Curva de calibrado: GenBlock

Para la realización de la curva de calibrado de la región *ITS2* de *Amphimerus* spp. se utilizó el ADN sintético GenBlock el cual contenía una concentración inicial de $4,25012 \times 10^{10}$ copias/ul, del cual se realizó una serie de diluciones seriadas de 1:10 cada una hasta llegar a la concentración de $4,25012 \times 10^3$ copias/ul, (total de 7 diluciones). Se utilizó el protocolo de termociclador y concentraciones estandarizado por medio los experimentos 1,2 y 3. Para la curva de calibrado se probaron las 7 diluciones por duplicado y una reacción sin la adición del templado (NTC, control negativo). Los parámetros obtenidos fueron del porcentaje de eficiencia, intercepto en Y, coeficiente de correlación (R^2) y pendiente, determinados por el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

La curva standard o curva de calibrado es de gran importancia en los procesos de estandarización de la PCR en Tiempo Real, debido a que muestra información acerca del desarrollo de la reacción como: el intercepto en Y, el coeficiente de correlación (R^2) y la pendiente. Son valores, los cuales se encuentran dentro de los parámetros aceptables (mencionados anteriormente en el Capítulo II), pueden determinar si la técnica es o no apta para su prueba en muestras.

4.5.6. Curva de calibrado: *Amphimerus* adulto

Se realizó una extracción de ADN de *Amphimerus* adulto, el cual al ser cuantificado llegó a una concentración de 77ng/μl, se realizaron 5 diluciones para la curva de calibrado hasta la concentración de 5 ng/μl. La curva de calibrado se realizó con el kit Master Mix GoTaq Probe ® de Promega. El protocolo de termociclador y concentraciones utilizado fue el estandarizado por medio de los experimentos 1, 2 y 3 previamente realizados. Para la identificación de un óptimo desarrollo de la PCR en tiempo real se observó los parámetros obtenidos del porcentaje de eficiencia y el coeficiente de correlación, determinados por el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

4.5.7. Sensibilidad: Número de metacercarias

Se realizó una prueba para detección de la sensibilidad de la técnica en número de metacercarias. En un tubo se separó una metacercaria, en el segundo tubo un total de 3 metacercarias y en la tercera muestra 5 metacercarias. El objetivo principal de este ensayo fue determinar la sensibilidad de la técnica, por medio de la hipótesis de si esta podía detectar un mínimo de una metacercaria. El ensayo se realizó por medio del kit Master Mix GoTaq Probe ® de Promega en el equipo de Bio Rad CFX96 y los resultados fueron observados en el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

4.5.8. Sensibilidad: Concentración de ADN inicial

Para la detección de la sensibilidad según la concentración inicial se realizaron dos ensayos: el primero para la detección del límite máximo y el segundo para la identificación del límite mínimo de concentración de ADN. Se realizó una qPCR con las concentraciones más altas obtenidas de *Amphimerus* spp. las cuales corresponden a 90, 85, 80 y 75 ng/μl para determinar si la concentración de ADN en altas cantidades afecta a la técnica. Para determinar el límite mínimo de detección de la técnica se realizaron diluciones por debajo de 1 ng/μl, las cuales fueron: 0,5; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 y 0,001 ng/μl. Los ensayos fueron realizados por el kit de Promega Master Mix GoTaq Probe ® en el equipo de Bio Rad CFX96, los resultados se observaron en el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

4.5.9. Especificidad de la Técnica

Para determinar la especificidad de la técnica se realizó una qPCR con ADN de *Fasciola* sp. y *Paragonimus* sp. El ADN fue extraído por el método de Chelex (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.) al 10%, por medio de protocolo de (Suenaga, 2005) descrito anteriormente. La extracción de ADN se realizó por duplicado, es decir, dos muestras por cada una, la técnica se realizó por

duplicado. Los resultados fueron visualizados en el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

4.5.10. Muestras: Tejido de pez trucha infectado con *Amphimerus* spp.

La infección de muestras se realizó para la detección de ADN de *Amphimerus* spp. en músculo de pez y si el peso y la cantidad de músculo afecta a la técnica. Se realizaron tres tipos de infecciones:

- a) Experimento 1: Músculo de trucha infectado con ADN de *Amphimerus* adulto después de la extracción de ADN. Posterior a la extracción de ADN del músculo de pescado se infectó con 1 µl de ADN de *Amphimerus* adulto a 90ng/µl. Como se puede observar en la Tabla. 5 el peso de músculo utilizado más el ADN de *Amphimerus* adulto de la repetición 1 y 2, indica si el peso o la cantidad de músculo utilizado afecta a la amplificación. Los controles utilizados fueron un positivo (ADN de *Amphimerus* adulto) y dos negativos (Músculo de trucha y NTC).
- b) Experimento 2: Músculo de trucha infectado con ADN de metacercaria después de la extracción de ADN: Al igual que en el apartado anterior, se realizó una infección al músculo de pescado con 1 µl ADN de metacercaria a una concentración de 36 ng/µl. El ensayo indica si el peso de músculo utilizado afecta a la amplificación de ADN de *Amphimerus* en estado de metacercaria.
- c) Experimento 3: músculo de trucha infectado con una metacercaria de *Amphimerus* spp. previo a la extracción de ADN: Debido a que las metacercarias de *Amphimerus* se desarrollan en el músculo de pescado, se realizó una infección de músculo de trucha con una metacercaria previo a la extracción de ADN. Las muestras involucran los pesos de músculo de pescado mencionados anteriormente (1, 5, 10 y 50 mg) y se realizó por duplicado, por lo que hay dos extracciones de ADN.

Los ensayos fueron realizados por el kit de Promega Master Mix GoTaq Probe® en el equipo de Bio Rad CFX96, los resultados se observaron en el software Bio Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR.

4.5.11. Cuantificación absoluta

Se realizó un ensayo para la identificación de la factibilidad de la cuantificación absoluta de metacercarias en una muestra. En un tubo se colocó una metacercaria, en otro dos y así sucesivamente hasta 40 metacercarias en un mismo tubo, el ensayo se realizó por duplicado. La extracción de ADN se realizó por método de Chelex-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.) al 10%, el protocolo utilizado fue el de (Suenaga, 2005) descrito anteriormente. Para la determinación de la factibilidad se calculó el coeficiente de correlación (R^2) de la cuantificación de ADN resultante de cada experimento por duplicado, se realizó un promedio de la repetición 1 y 2 de los dos ensayos. Se procedió a hacer la graficación de los resultados obtenidos para determinar la línea de tendencia y el coeficiente de correlación.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estandarización de la técnica molecular PCR en Tiempo Real

5.1.1. Experimento 1: Gradiente de temperatura de hibridación

- Rango 1 (54-62°C)

El primer rango de temperaturas fue de 54 a 62°C, tomando en cuenta específicamente a las temperaturas menores a 60°C. En la Tabla 8 se puede identificar que el menor Ct es el correspondiente a 62°C, lo que indica que se requiere de un menor número de ciclos para que la fluorescencia de la amplificación sea detectada, además, como se puede observar en la Figura 12, la curva a 62°C supera a las demás curvas lo que indica que las temperaturas más altas de este rango son más eficientes para esta técnica.

Tabla 8.

Ciclo de umbral (Ct) resultante de cada variante de temperatura (Rango 1).

Temperatura (°C)	Ct	Cantidad Inicial
62	12,16	1E8
60	12,29	1E8
58	12,89	1E8
56	12,24	1E8
54	12,24	1E8

GRADIENTE TEMPERATURA DE ANNEALING: RANGO 1

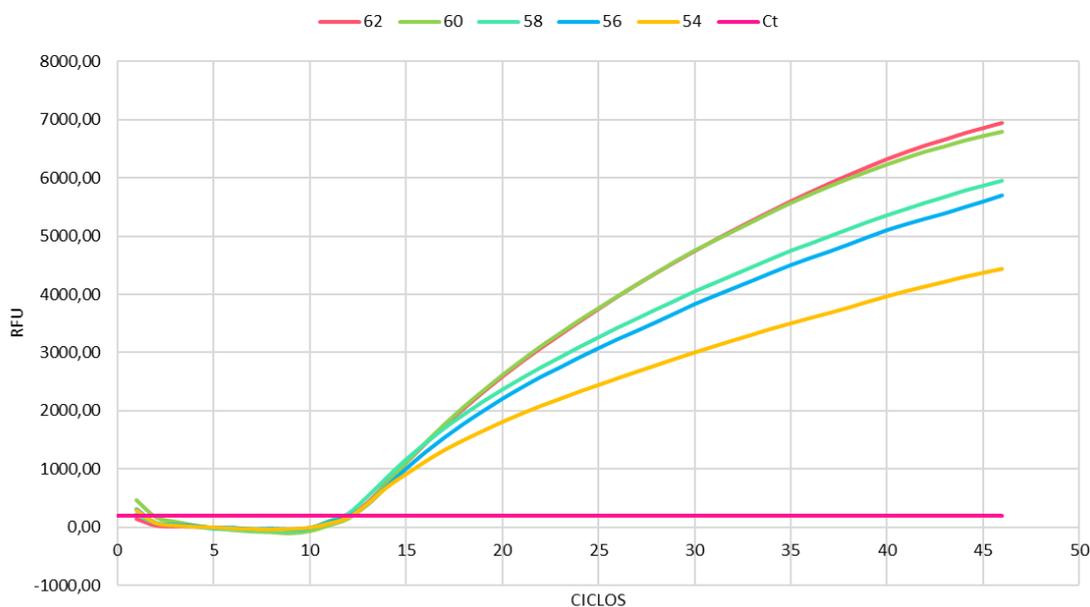


Figura 12. Amplificación de la dilución (108) en gradiente de temperatura (54-62°C).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

- Rango 2 (60-66°C)

En el segundo rango se toma en cuenta las temperaturas mayores a 60°C, también se realizó la repetición de las temperaturas 60°C y 62°C. Como se puede observar en la Tabla 9 el Ct resultante del gradiente a 62°C es el menor en comparación con el resto de las temperaturas, indicando que se requiere de

un menor número de ciclos para que la muestra (10^8) cruce el umbral dando una mayor eficiencia a la técnica, al igual como se muestra en la Figura 13, la curva resultante de la variante 62°C es mayor o más alta que las demás. Sin embargo, varias investigaciones realizadas en trematodos indican que la temperatura óptima de hibridación es de 60°C como lo indica (Kelly, 2016)

Tabla 9.

Ciclo de umbral (Ct) resultante de cada variante de temperatura (Rango 2).

Temperatura (°C)	Ct	Cantidad inicial
66	13,33	1E8
64	12,95	1E8
62	12,45	1E8
60	12,46	1E8

GRADIENTE DE TEMPERATURA DE ANNEALING: RANGO 2

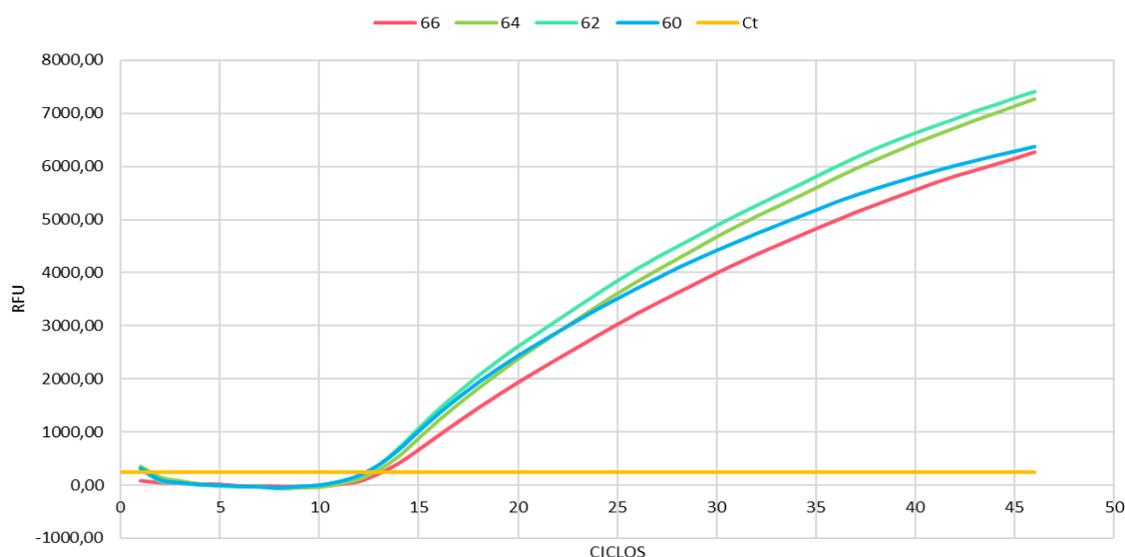


Figura 13. Amplificación de la dilución (10^8) en gradiente de temperatura (60-66°C).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

La temperatura óptima para la amplificación de la región *ITS2* de *Amphimerus* spp. es 62°C, esto se puede comprobar por medio de la Temperatura de

Denaturación (T_m) de cada uno de los cebadores utilizados y el tamaño del amplicón resultante (206pb). Según (Rahman, 2011) la temperatura de hibridación óptima de la estandarización de la RT-PCR en tiempo real para *Clonorchis sinensis* es de 62 °C. Esta correlación puede darse debido a la utilización de la región *ITS2* de trematodos de la misma familia en ambas investigaciones.

5.1.2. Experimento 2: Gradiente de Denaturación (93-95°C)

Los resultados fueron favorables para la mayor temperatura, conteniendo un menor número de Ct (Tabla. 10) y la curva indica una mayor fluorescencia en los últimos ciclos (Figura 14), lo que determina que a esta temperatura la amplificación resultante es mayor en comparación a la curva de 93°C.

Esto se debe a que la enzima Polimerasa que se encuentra en el *Master Mix* de la reacción, es una “*Hot Start Polymerase*” es decir que se activa a altas temperaturas, específicamente a 94 °C y 95 °C, ya que se encuentra ligada a un anticuerpo que bloquea la actividad enzimática. Esto ayuda a evitar la amplificación inespecífica y la formación de dímeros de cebadores, dando como resultado una mayor formación del amplicón esperado (Promega, 2018). Además investigaciones como Kelly y colaboradores, (2016); y Rahman (2011) han indicado que la temperatura óptima de denaturación es de 95°C (Kelly, 2016; Rahman, 2011).

Tabla 10.

Gradiente de temperatura de Denaturación. Ciclo de Umbral (Ct)

Temperatura (°C)	Ct	Cantidad inicial
95	11,70	1E8
93	13,37	1E8

GRADIENTE DE TEMPERATURA DE DENATURACIÓN

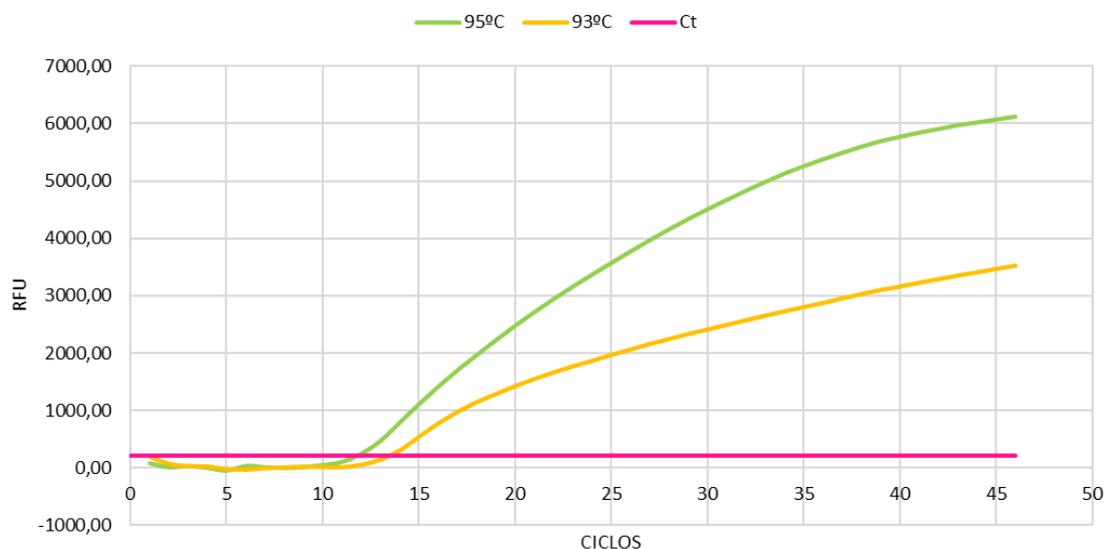


Figura 14. Gradiente de temperatura de Denaturación (93 y 95°C).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

5.1.3. Experimento 3: Gradiente de Cebadores

El Ct resultante fue menor en la concentración de 0,9 μM (Tabla 11), como ya se ha mencionado anteriormente, el valor del Ct es favorable cuando es menor, debido a que se requiere un menor número de ciclos para que la amplificación del templado cruce el umbral, favoreciendo a las muestras con mínima concentración de ADN para su amplificación. También, como se puede observar en la (Figura 15) la prueba (a) como (b) de la concentración máxima de cebadores probada, emite una fluorescencia mayor al resto de concentraciones, lo que indica una amplificación superior y una mayor producción de moléculas resultantes. Rahman y colaboradores, (2011), indicó que la concentración óptima de gradientes de primers es de 0,9 μM , sin embargo, otras investigaciones como la de Kelly y colaboradores, (2016), determinaron que la concentración óptima es de 0,2 μM . Por lo que se puede identificar que la concentración óptima de cebadores depende del tipo de

circunstancias, variables, muestras, etc. Determinando que cada caso es diferente (Kelly, 2016; Rahman, 2011).

Tabla 11.

Gradiente de concentración de cebadores

Concentración (μM)	Ct	Cantidad inicial
0,2	11,45	1E8
0,5	12,29	1E8
0,9	11,76	1E8
0,2	12,38	1E8
0,5	12,18	1E8
0,9	11,79	1E8
NTC	0,00	-

Nota: micro Molar (μM). Ct ciclo de Umbral. (NTC) Control Negativo.

GRADIENTE DE PRIMERS

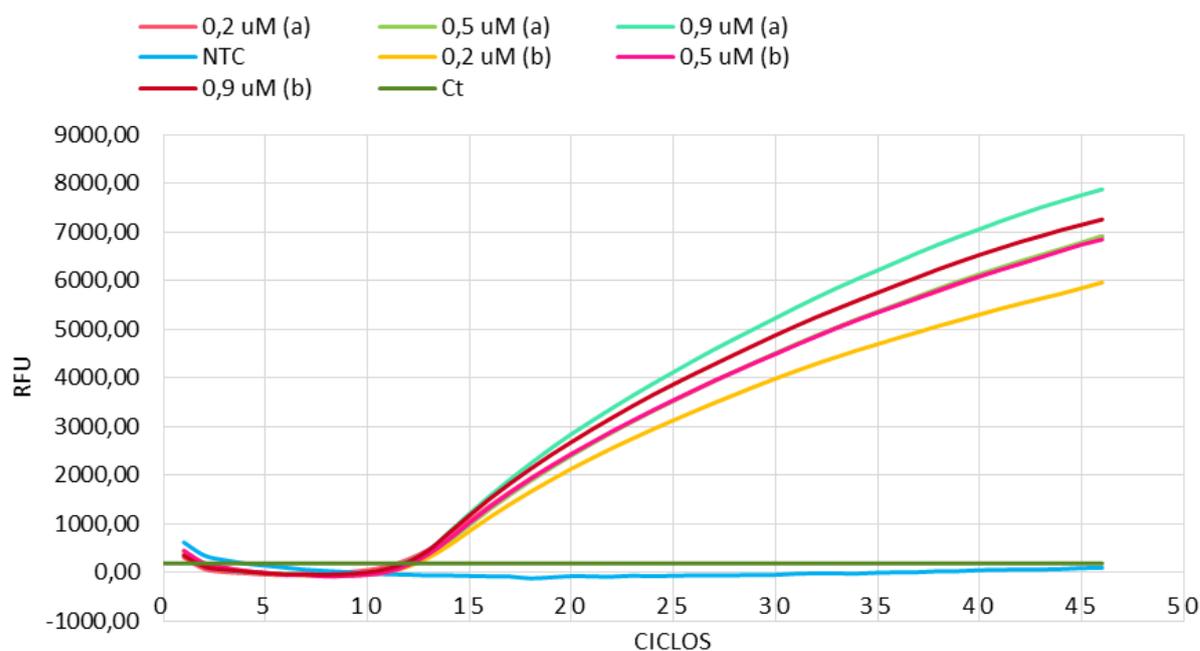


Figura 15. Gradiente de concentración de Cebadores en micro Molar (0,2; 0,5 y 0,9 μM).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

5.2. Análisis estadístico

Se realizó una prueba estadística ANOVA para determinar la diferencia significativa entre los Ct obtenidos de cada gradiente, la significancia total resultante después de la prueba ANOVA fue de 0.110 (Figura 16), el cual es mayor al valor de 0,05 por lo que se mantiene la hipótesis nula, la cual en este caso indica que los gradientes no afectan significativamente al ciclo de umbral de la amplificación de la dilución (10^8). Se realizó una prueba post hoc de Tukey (Figura 17) en la cual indica la diferencia significativa entre gradiente de temperatura de hibridación y denaturación, denaturación y cebadores, hibridación y cebadores. Los resultados obtenidos de significancia fueron mayores a 0,05 indicando que no existen diferencias significativas entre estos parámetros.

Por lo que se puede determinar que para la realización de una óptima PCR en tiempo real, la temperatura de hibridación debe encontrarse entre 54-66°C y el gradiente de concentración de cebadores entre 0,2 y 0,9 μM . En la investigación (Horgan, 2002) se realizó una prueba estadística ANOVA para determinar la diferencia significativa entre el gradiente de temperaturas y concentraciones de cebadores, en la estandarización de una RT-PCR en tiempo real (relativa), la significancia del gradiente de cebadores fue menor a 0,05 por lo que indicó que la concentración de cebadores afecta a la amplificación de las muestras. De esta manera se puede identificar la importancia de las pruebas estadísticas después de los ensayos y experimentos de estandarización de las técnicas moleculares, ya que pueden indicar si los parámetros obtenidos afectan o no de manera significativa a los resultados.

ANOVA

CT

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.417	2	.709	2.666	.110
Dentro de grupos	3.190	12	.266		
Total	4.607	14			

Figura 16. Prueba ANOVA, significancia mayor a 0,05.

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: CT
HSD Tukey

(I) Temperatura	(J) Temperatura	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
TA	TD	.08357	.41337	.978	-1.0193	1.1864
	GP	.64357	.28684	.104	-.1217	1.4088
TD	TA	-.08357	.41337	.978	-1.1864	1.0193
	GP	.56000	.42096	.406	-.5631	1.6831
GP	TA	-.64357	.28684	.104	-1.4088	.1217
	TD	-.56000	.42096	.406	-1.6831	.5631

Figura 17. Prueba post hoc, Tuckey, significancias mayores a 0,05.

5.3. Curvas de calibrado

5.3.1. Curva de calibrado: GenBlock (Región ITS2)

En la Tabla 12 se observa el Ct de cada dilución seriada del GenBlock y se determina que la dilución que contiene mayor concentración de ADN (10^9) contiene el menor número de Ct, y como se puede identificar en la Figura 18 es la primera curva en cruzar el umbral, por lo que su amplificación es la primera en detectarse, seguida de las siguientes diluciones en orden descendente hasta la dilución 10^3 . En la Figura 19 se observa las curvas logarítmicas, indicando de manera más visible la intersección de cada curva con el umbral, determinando específicamente el Ct de cada uno.

Por medio de los datos obtenidos de la curva logarítmica, se obtiene la curva lineal entre cada Ct obtenido y el logaritmo de la concentración inicial standard de cada dilución respectivamente (Figura 20). Los parámetros obtenidos del coeficiente de correlación, pendiente, intercepto en Y, y la eficiencia se encuentran en la Tabla 13. El R^2 obtenido fue de 0,996, el cual se encuentra cercano a 1, lo que indica que se encuentra dentro del parámetro óptimo; la eficiencia se encontró en un 99,77% lo que también indica que se encuentra dentro del rango aceptable.

El desarrollo de una PCR en Tiempo Real en *Clonorchis sinensis* de Cai y colaboradores, (2012), indica que el coeficiente de correlación obtenido fue de 0,990 utilizando 7 diluciones, como en este caso, llegando al 100% de sensibilidad, superando a los resultados obtenidos por microscopía, demostrando la superioridad de las técnicas moleculares, especialmente la PCR en Tiempo Real, sobre las técnicas de microscopía (Cai , 2012). El coeficiente de correlación obtenido en este proyecto fue de 0,996 siendo ligeramente mayor al obtenido por Cai , 2012, esto indica que cada dilución probada se duplica constantemente en cada ciclo y la correlación entre el número de ciclos de umbral (Ct) en cada punto es aproximadamente el mismo.

Según Cai (2012) y Kelly (2016), indica que para obtener una eficiencia al 100% o cercana, el Ct de cada dilución debe variar en -3,3 ciclos a la siguiente. Por lo que se puede determinar que la curva de calibrado realizada en este apartado es altamente eficiente y que los parámetros de los experimentos 1, 2 y 3 (realizados anteriormente) son correctos para el desarrollo de la técnica (Kelly, 2016; Cai, 2012).

Tabla 12.

Ct ciclo de umbral de cada dilución del GenBlock y Cantidad inicial logarítmica de cada una.

Dilución	Ct	Cantidad inicial logarítmica	Dilución	Ct	Cantidad inicial logarítmica
1e9 a	8,99	9,000	1e9 b	10,35	9,000
1e8 a	12,18	8,000	1e8 b	12,11	8,000
1e7 a	16,06	7,000	1e7 b	16,04	7,000
1e6 a	18,44	6,000	1e6 b	19,18	6,000
1e5 a	22,48	5,000	1e5 b	22,24	5,000
1e4 a	26,15	4,000	1e4 b	25,66	4,000
1e3 a	29,31	3,000	1e3 b	29,58	3,000

Amplificación

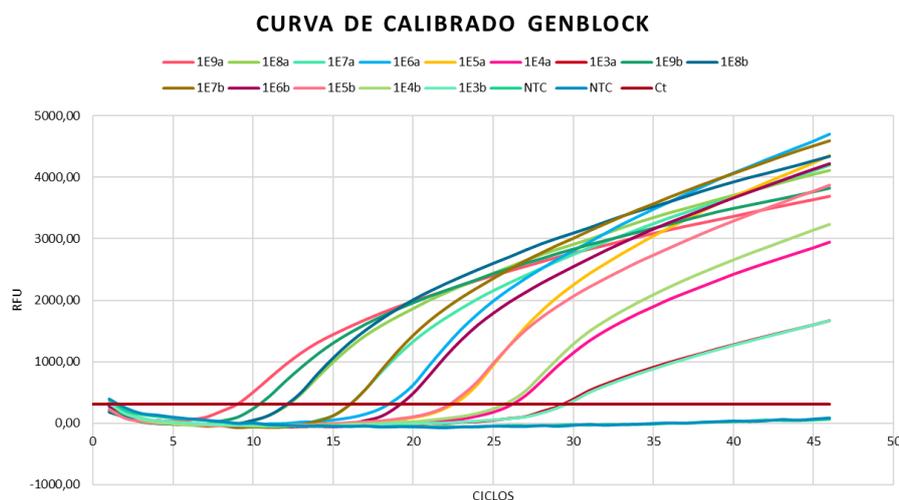


Figura 18. Amplificación de diluciones del GenBlock (1E9-1E3).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

Curva logarítmica

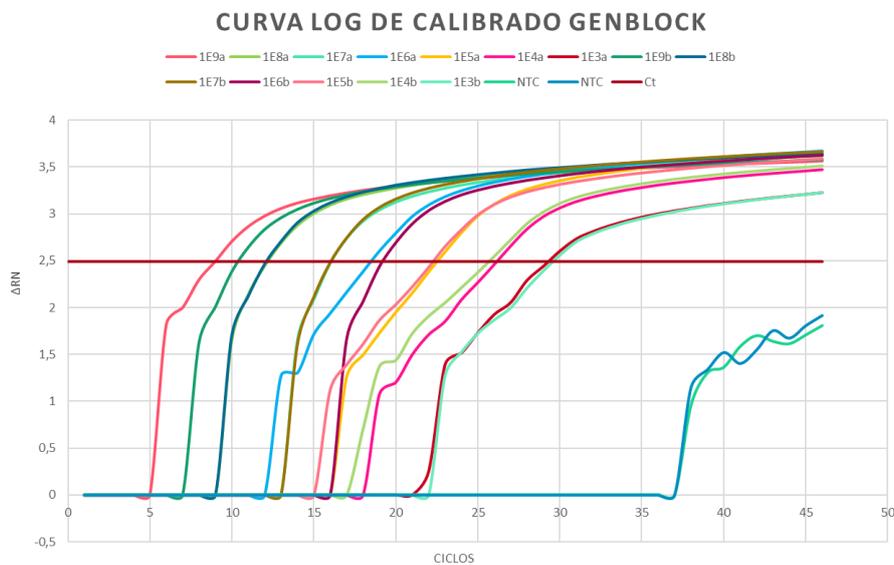


Figura 19. Curva logarítmica de la amplificación de las diluciones del GenBlock, intersección de cada curva con el umbral.

- a. (Ct) Ciclo de Umbral.
- b. (ΔRn) Log 10 de RFU
- c. RFU Unidades de fluorescencia relativa
- d. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).

Curva de calibrado

Tabla 13.

Parámetros obtenidos de la curva de calibrado.

Fluoróforo	Eficiencia %	Pendiente	Intercepto en Y	R²
FAM	99,77	-3,328	39,162	0,996

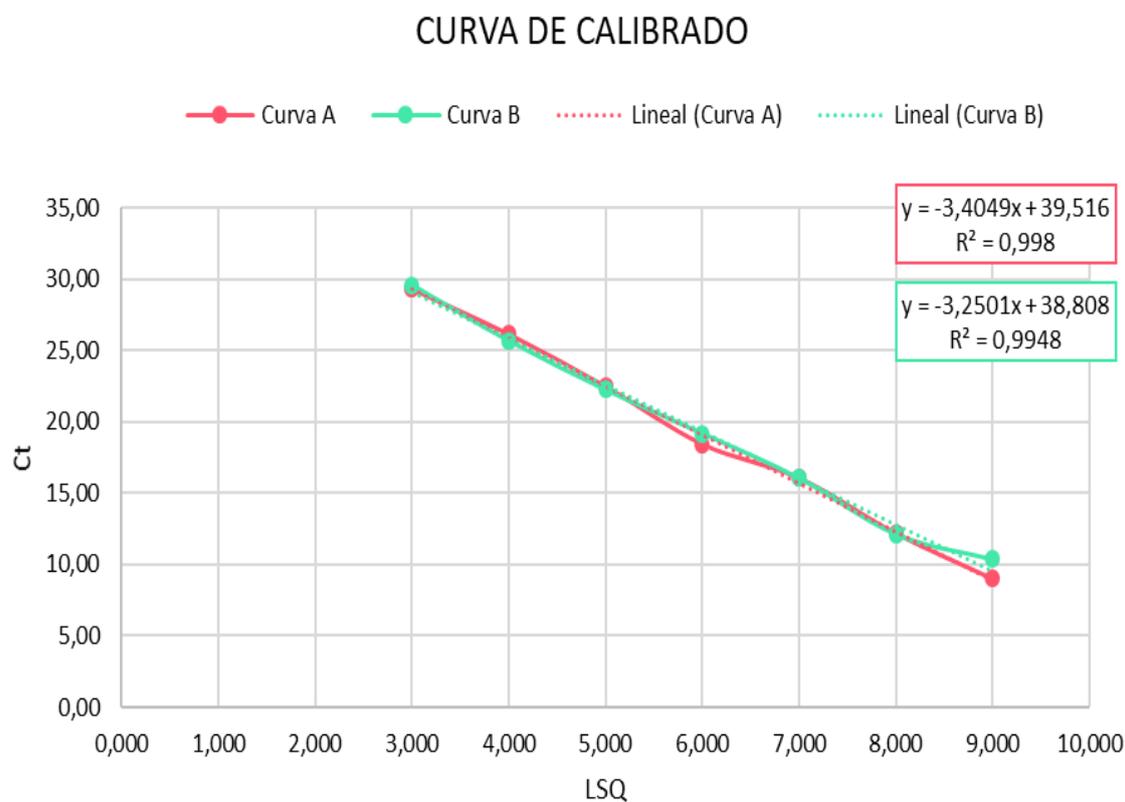


Figura 20. Curva de calibrado, gráfico lineal.

a. (Log SQ) Cantidad inicial logarítmica (eje Y) vs. (Ct) Ciclo de Umbral (eje X).

5.3.2. Curva de calibrado: *Amphimerus* adulto

El Ct (Tabla. 14) obtenido de cada curva indica el número de ciclo en el cual la fluorescencia obtenida cruza el umbral. De igual manera como se puede observar en las Figuras 21 y 22 la amplificación de cada dilución y el punto de intersección de cada una. Los resultados indican que la concentración más alta de ADN de *Amphimerus* mantiene un Ct menor a las demás curvas.

La curva de calibrado obtenida de la amplificación de ADN de adulto de *Amphimerus* indica un coeficiente de correlación de 0,985 el cual se encuentra dentro del rango óptimo, al igual que la eficiencia obtenida de 96,46% como se muestra en la Tabla 15. La Figura 23 indica la curva de calibrado con ADN de *Amphimerus* adulto.

Según Horgan, (2002), y Schmittgen, (2008) indican que la realización de una curva de calibrado con el ADN de las muestras y no con el GenBlock, es de gran importancia debido a la presencia de varios factores que puede contener una muestra como inhibidores de la PCR, falencias en la extracción de ADN, residuos de individuos, contaminaciones, etc. Por lo que los resultados obtenidos indican si estos factores mantienen un efecto sobre la técnica. En este caso los parámetros tanto de eficiencia como del coeficiente de correlación indican que la extracción de ADN, residuos y contaminaciones que podría tener el parásito adulto, no afectan al desarrollo de la técnica (Horgan, 2002; Schmittgen, 2008).

Tabla 14.

Ct ciclo de umbral de cada dilución de ADN de Amphimerus adulto.

Dilución (ng/μl)	Ct
77	23,69
60	24,13
40	24,87
20	25,35
10	26,86
5	27,80
NTC	-

Amplificación

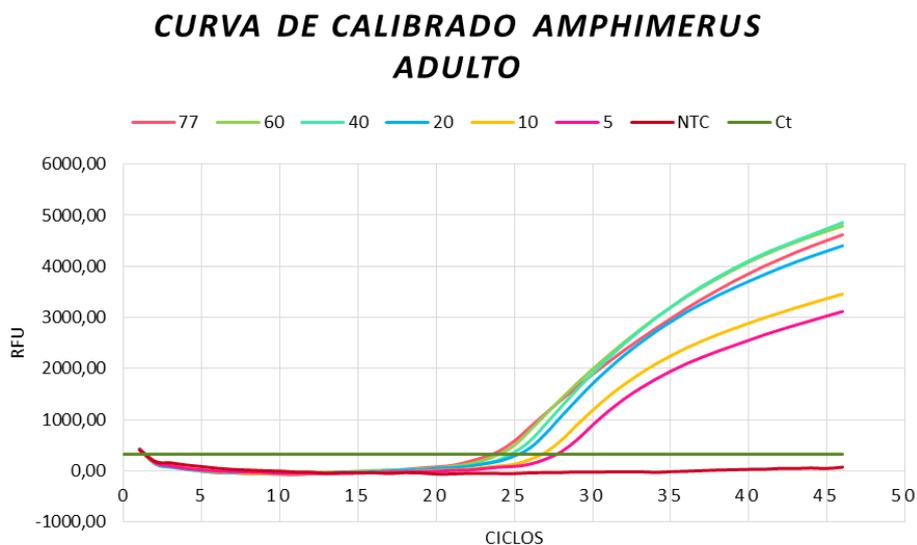


Figura 21. Amplificación de diluciones de ADN de Amphimerus adulto (77-5 ng/ μ l).

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

Curvas logarítmicas

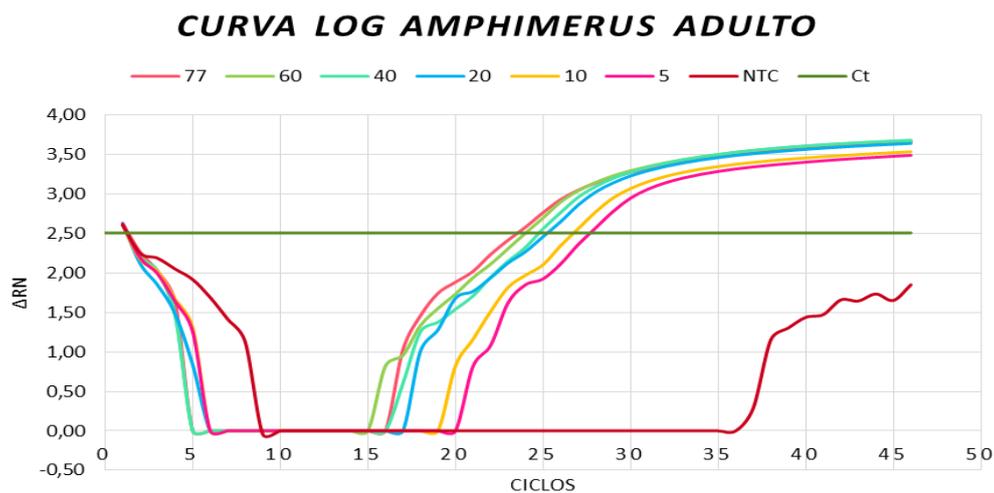


Figura 22. Curva logarítmica de la amplificación de las diluciones de ADN de Amphimerus adulto, intersección de cada curva con el umbral.

- a. (Ct) Ciclo de Umbral.

- b. (ΔR_n) Log 10 de RFU
- c. RFU Unidades de fluorescencia relativa
- d. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).

Curva de calibrado

Tabla 15.

Parámetros obtenidos de la curva de calibrado, ADN de *Amphimerus adulto*.

Fluoróforo	Eficiencia %	Pendiente	Intercepto en Y	R ²
FAM	96,46	-3,410	30,150	0,985

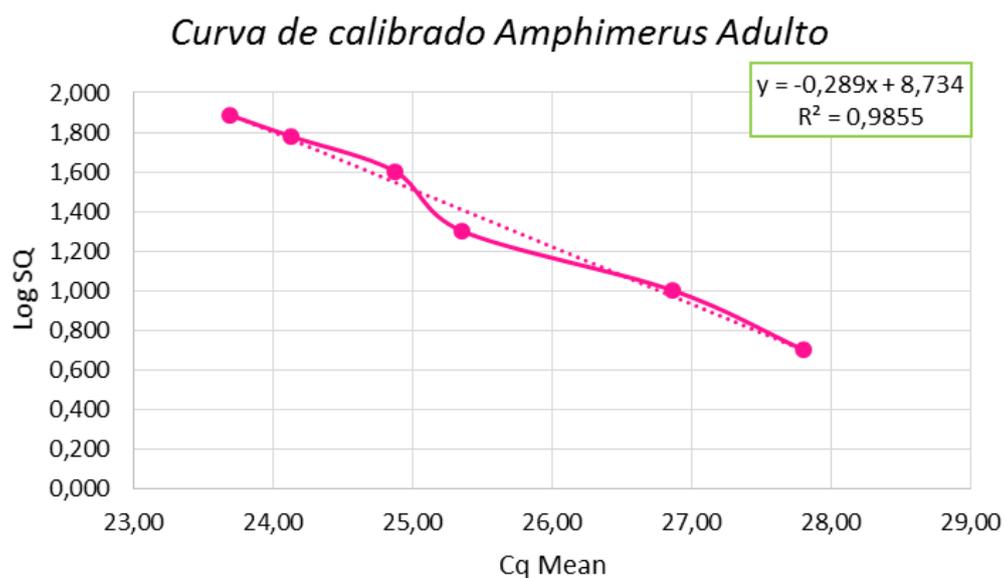


Figura 23. Curva de calibrado, gráfico lineal.

- a. (Log SQ) Cantidad inicial logarítmica (eje Y) vs. (Ct) Ciclo de Umbral (eje X).

5.4. Sensibilidad

5.4.1. Sensibilidad por número de metacercarias

Como se puede observar en la Tabla 16 y en la Figura 24, la amplificación de 1, 3 y 5 metacercarias fue positiva con un Ct de 23,20; 21,79 y 25,98

respectivamente. La sensibilidad determinada en este ensayo es del 100%, ya que el objetivo de esta prueba fue identificar si la técnica puede detectar como mínimo una metacercaria y resultó positivo en 3 de 3 ensayos. La eficiencia se determinó mediante los ensayos de Bustin y colaboradores, (2009), el cual obtuvo una sensibilidad del 100%, debido a que se obtiene por el número de muestras positivas sobre el número de muestras totales por 100% (Bustin, 2009). Una sensibilidad del 100% indica que la técnica es altamente efectiva dentro de los parámetros estandarizados y dentro de las muestras probadas (Cai , 2012). Por lo que se puede determinar que la PCR en tiempo real, estandarizada en este proyecto, es 100% sensible para la detección de mínimo 1 metacercaria, en los parámetros obtenidos de la previa estandarización. Estudios realizados para la detección de trematodos por PCR en tiempo real (cuantificación absoluta) en sus diferentes estadios como el de cercaria (Kelly , 2016) encontrados en el primer intermediario del ciclo (moluscos), indicaron que la sensibilidad de la técnica fue del 100% ya que determinaba un mínimo de 1 cercaria.

Tabla 16.

Número de metacercarias, (Ct) Ciclo de umbral.

Metacercarias (unidades)	Ct
1A	23,20
3A	21,79
5A	25,98

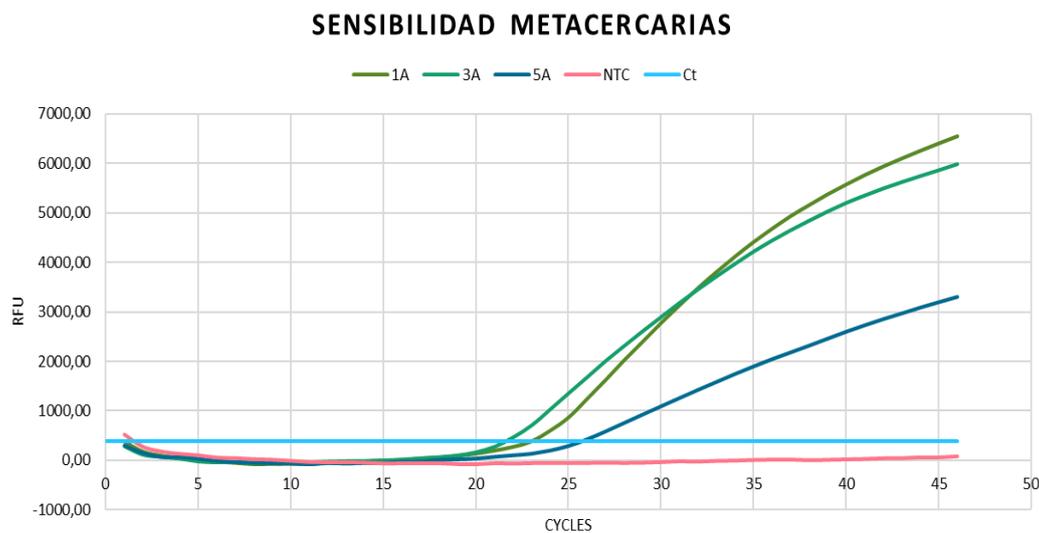


Figura 24. Amplificación de metacercarias por unidades (1,3 y 5 metacercarias).

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

5.4.2. Sensibilidad por concentración de ADN

- Concentración máxima

Como se muestra en la Tabla 17 y la Figura 25 el Ct de cada muestra indica un resultado descendente según la concentración, la muestra con mayor concentración mantiene el menor Ct, lo cual indica que las concentraciones menores a 90 ng/μl son óptimas para su desarrollo. Sin embargo, no se pudo determinar la concentración máxima límite para esta técnica, debido a la falta de obtención de mayores concentraciones en la extracción de ADN. Para que la amplificación sea óptima para la detección de trematodos de vías biliares, la concentración de ADN debe encontrarse en el rango de 20 a 100 ng/μl (Kelly, 2016).

Tabla 17.

Ct ciclo de umbral de concentración máxima de ADN de Amphimerus spp.

Concentración (ng/μl)	Ct
90 ng/ul	24,22
85 ng/ul	24,61
80 ng/ul	24,68
75 ng/ul	25,08
NTC	-

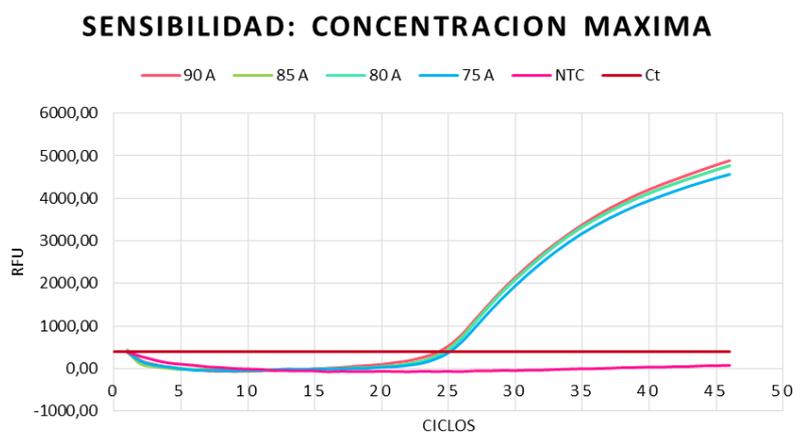


Figura 25. Amplificación de concentraciones máximas de ADN de Amphimerus spp. (90, 85, 80 y 75 ng/μl).

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
 - b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
 - c. NTC Control Negativo.
- Concentración mínima

Como se puede observar en la Tabla. 18 el Ct máximo obtenido fue de la dilución de 0,5 ng/μl, el cual cruza el umbral al ciclo 29,26 como se muestra en la Figura 26. La concentración mínima detectable fue de 0,05 ng/μl, que equivale a 50 pg/μl. Estudios, como el de (Rahman, 2011), indican que la concentración mínima detectable por la qPCR es de 1 pg/μl por lo que se considera una técnica altamente sensible. Las posibles causas de que la técnica no haya amplificado en las últimas concentraciones pueden ser debido a la presencia de inhibidores de la PCR que impidan el desarrollo de la técnica con una concentración de ADN baja, el inhibidor probable en este caso es el

chelex, usado para la extracción de ADN de *Amphimerus*, ya que investigaciones indican que este compuesto puede detener el desarrollo de la técnica (Lamballerie, 1992; Walsh, 1991). Otro factor puede ser el error de pipeteo al momento de realizar las diluciones o la adición de ADN al mix de PCR. Estudios indican que le error de pipeteo se genera en un 10% por cada experimento realizado (Bergeron, 2003; Schilling, 2005; Varkonyi, 2007).

Tabla 18.

Ct ciclo de umbral de concentración mínima de ADN de Amphimerus spp.

Concentración (ng/μl)	Ct
0,5ng/ul	29,26
0,1ng/ul	43,33
0,05ng/ul	44,63
0,025ng/ul	-
0,010ng/ul	-
0,001ng/μl	-
NTC	-

SENSIBILIDAD: CONCENTRACION MINIMA

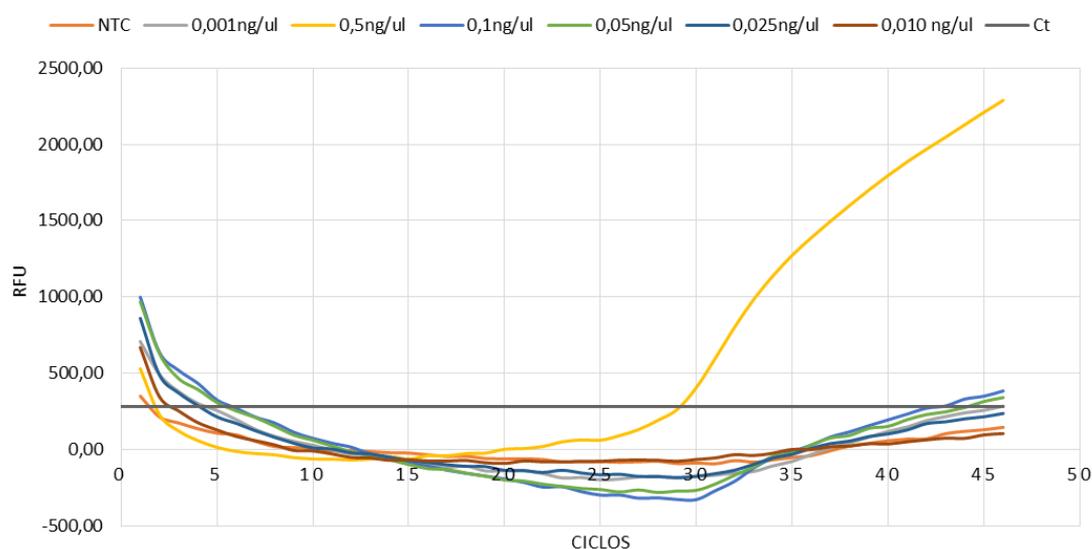


Figura 26. Amplificación de concentraciones mínimas de ADN de *Amphimerus* spp. (0,5; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 y 0,001 ng/μl).

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

5.5. Especificidad empleando ADN de otros trematodos (*Paragonimus* y *Fasciola*).

Las curvas representadas en la Figura 27 y los resultados obtenidos del Ct (Tabla. 19) indican que no hubo amplificación en las muestras de *Fasciola* y *Paragonimus* lo cual determina la especificidad de la técnica. Como ya se mencionó anteriormente en el Capítulo II, las tres principales trematodiasis en el Ecuador son: fasciolosis, paragonimiasis y amphimeriasis. Por esta razón se escogió a estos géneros y no a *Clonorchis* y *Opisthorchis* que son los más cercanos a *Amphimerus*. Otra razón por la que no se probó con estos géneros es debido a la falta de muestras de *Clonorchis* y *Opisthorchis*.

Tabla 19.

Prueba de especificidad con Fasciola sp. y Paragonimus sp.

Muestra	Ct	Muestra	Ct
<i>Fasciola</i> 1 (a)	-	<i>Fasciola</i> 1 (b)	-
<i>Fasciola</i> 2 (a)	-	<i>Fasciola</i> 2 (b)	-
<i>Paragonimus</i> 1 (a)	-	<i>Paragonimus</i> 1 (b)	-
<i>Paragonimus</i> 2 (a)	-	<i>Paragonimus</i> 2 (b)	-
<i>Amphimerus</i> (a)	26,52	<i>Amphimerus</i> (b)	26,52

Nota: (Ct)ciclo de umbral, (a) repetición 1, (b) repetición 2, *Amphimerus* control positivo.

ESPECIFICIDAD: *FASCIOLA SP.* Y *PARAGONIMUS SP.*

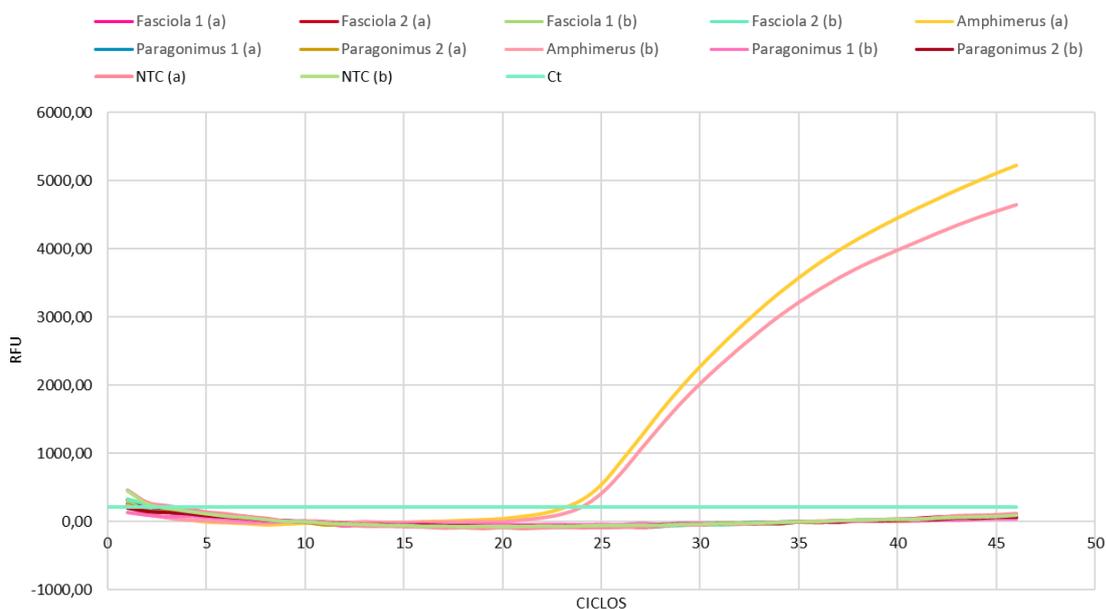


Figura 27. Amplificación de muestras de *Fasciola* y *Paragonimus*.

- RFU Unidad de fluorescencia relativa
- RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- NTC Control Negativo.

5.6. Muestras: Tejido de pez trucha infectado con *Amphimerus* spp.

5.6.1. Experimento 1: Músculo de trucha infectado con ADN de *Amphimerus* adulto después de la extracción.

Los datos resultantes del Ct (Tabla. 20) indican que las primeras muestras en cruzar el umbral son las que contienen menor cantidad de músculo (1mg) mientras que el aumento de cantidad retarda la reacción por lo que la amplificación cruza varios ciclos después.

Tabla 20.

Músculo de Trucha infectado con ADN de Amphimerus adulto por duplicado.

Peso (mg)	Muestra (a)	Ct	Muestra (b)	Ct
1mg	MT+AA (a)	30,31	MT+AA (b)	30,27
5mg	MT+AA (a)	31,67	MT+AA (b)	39,44
10 mg	MT+AA (a)	30,73	MT+AA (b)	39,84
50 mg	MT+AA (a)	31,71	MT+AA (b)	41,85

Nota: (MT) músculo de trucha, (AA) ADN de Amphimerus adulto, (Ct) ciclo de umbral, (a) repetición 1, (b) repetición 2.

Además, se puede observar que la presencia de músculo de pescado afecta a la amplificación, como se puede observar en la Tabla. 20 y Figura 28 los cuales indican que el Ct resultante del control positivo 23,36 y 22,99 ciclos para la repetición 1 y 2 respectivamente. Al comparar con el Ct de las muestras se puede observar que el control positivo cruza aproximadamente 7,115 ciclos antes que las muestras. Esto se debe a la concentración de ADN inicial de los controles y las muestras, mientras que el ADN del control fue exclusivamente ADN de *Amphimerus*, las muestras contenían ADN de pescado en cantidades de 1, 5, 10 y 50 mg por lo que afecta la concentración de ADN colocada en la reacción. Finalmente, se puede determinar que la cantidad de músculo de pescado afecta a la cantidad inicial de ADN de *Amphimerus* y por ende a la amplificación resultante y el número de ciclos por que la amplificación cruza el umbral (Ct).

Tabla 21.

Controles utilizados en la infección de Músculo de Trucha con ADN de Amphimerus adulto.

Tipo de control			Ct
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (a)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus</i> adulto (a)	90 ng/ul	23,36
<i>Control negativo</i>	NTC (a)		-
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (b)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus</i> adulto (b)	90 ng/ul	22,99
<i>Control negativo</i>	NTC (b)		-

Nota: (a) repetición 1, (b) repetición 2.

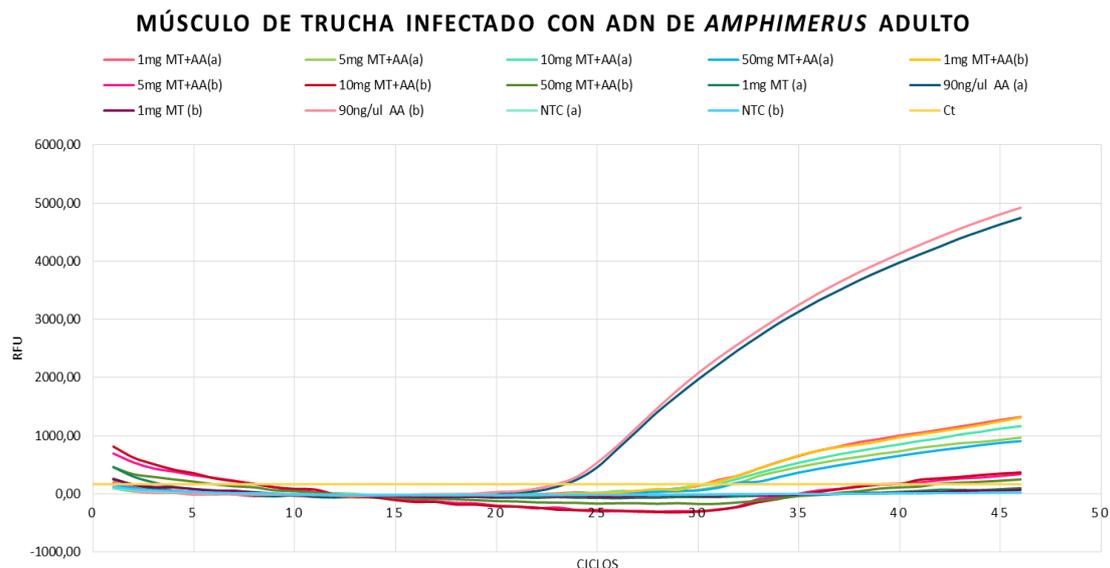


Figura 28. Amplificación de Músculo de trucha infectado con ADN de *Amphimerus* adulto.

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

5.6.2. Experimento 2: Músculo de trucha infectado con ADN de *Metacercaria* después de la extracción

Como se puede observar en la Tabla. 22 los resultados indican que la muestra con menor cantidad de músculo cruza el umbral a 35,11 ciclos mientras que la muestra con mayor cantidad cruza aproximadamente al ciclo 41,77 (promedio entre repetición 1 y 2). La cantidad de músculo afecta a la concentración de ADN de metacercaria como se puede comparar con la Tabla. 23 el control positivo utilizado fue ADN de metacercaria el cual cruza el umbral al ciclo 26, 40 (promedio de repetición 1 y 2) y como se puede observar en la Figura 29 la fluorescencia relativa final del control y las muestras mantienen una alta diferencia. Sin embargo, a pesar la poca cantidad de ADN resultante *Amphimerus*, se puede determinar que a 50mg de músculo de pescado es

detectable 36 ng de ADN de metacercaria. Por lo que se puede determinar la técnica es altamente sensible para muestras con músculo de pez.

Tabla 22.

Músculo de Trucha infectado con ADN de Amphimerus en estado de metacercaria por duplicado.

Peso (mg)	Muestra (a)	Ct	Muestra (b)	Ct
1mg	MT+met (a)		MT+met (b)	35,11
5mg	MT+met (a)	38,44	MT+met (b)	-
10 mg	MT+met (a)	44,91	MT+met (b)	-
50 mg	MT+met (a)	38,15	MT+met (b)	45,39

Nota: (MT) músculo de trucha, (met) ADN de metacercaria, (Ct) ciclo de umbral, (a) repetición 1, (b) repetición 2.

Tabla 23.

Controles utilizados en la infección de Músculo de Trucha con ADN de Amphimerus en estado de metacercaria.

Tipo de control			Ct
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (a)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus metacercaria</i> (a)	36 ng/ul	26,77
<i>Control negativo</i>	NTC (a)		-
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (b)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus metacercaria</i> (b)	36 ng/ul	26,03
<i>Control negativo</i>	NTC (b)		-

Nota: (a) repetición 1, (b) repetición 2.

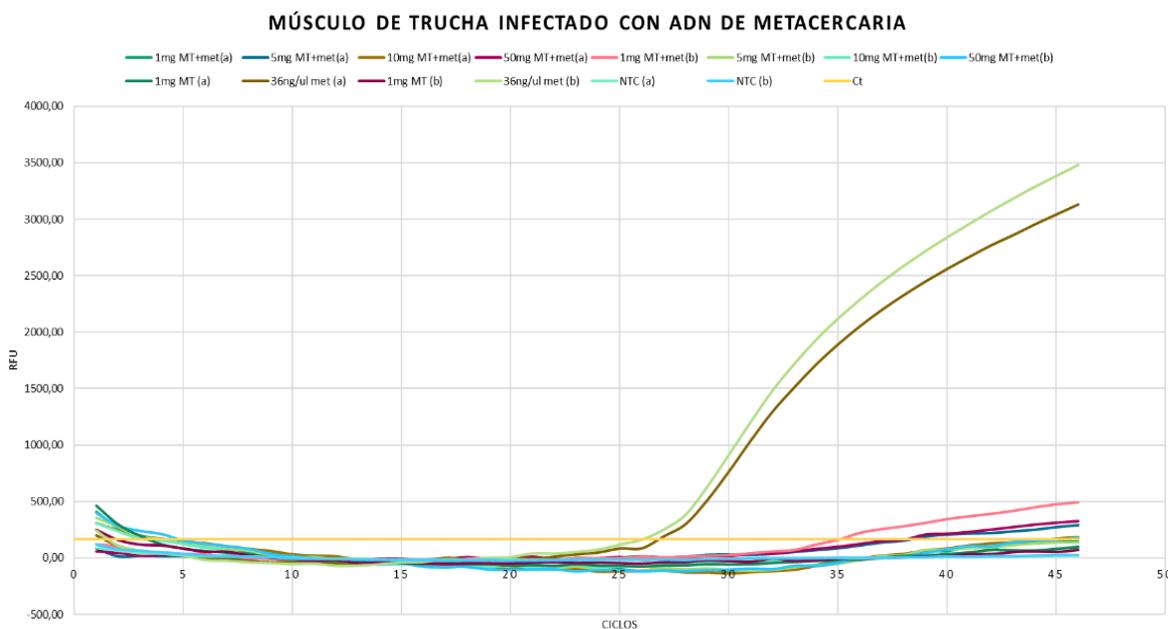


Figura 29. Amplificación de Músculo de trucha infectado con ADN de *Amphimerus* en estado de metacercaria.

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

5.6.3. Experimento 3: Músculo de Trucha y metacercaria extracción con Chelex 1 y 2

Los resultados obtenidos (Tabla. 24 y 25) demuestran la amplificación de *Amphimerus* en cada peso. El menor peso de músculo (1 mg) cruza el umbral al ciclo 22,83 (promedio de la repetición 1 y 2 Tabla. 25), mientras que el resultado del mayor peso (50 mg) cruza el umbral en el ciclo 42,77 (Tabla. 24). Al comparar los resultados de las Tablas. 24 y 25 con la Tabla. 23 se puede observar que las muestras infectadas con una metacercaria de *Amphimerus* cruzan el umbral un aproximado de 12,275 ciclos antes que las infectadas con ADN de metacercaria, lo cual indica que las metacercarias contenían 12,275 más ADN que la anterior infección.

Los resultados de la Tabla. 24 indican que no hubo amplificación en los pesos 1 y 5 mg en ambas repeticiones, mientras que en la Tabla. 25 no hubo amplificación en los pesos 10 y 50 mg. Esto se debe a la separación de metacercarias por medio de microscopía, ya que se debe a una técnica poco sensible, las metacercarias colocadas para los ensayos pudieron ser metacercarias de otro trematodo o pudieron ser confundidas con contaminación de la digestión artificial de peces lo que genera resultados negativos.

Como se puede observar en la Tabla. 26 y Figuras 30 y 31 el cruce del umbral por el control positivo (ADN de metacercaria a 36 ng/μl) y muestras del peso de 1 mg (extracción 1 y 2) indican que las muestras mantienen un menor Ct en comparación a los controles por lo que contienen una mayor cantidad de ADN inicial. Esto se debe a varios factores: tamaño de las metacercarias, ya que pueden haber metacercarias de mayor tamaño o menor; o a al tipo de extracción y tiempo de almacenamiento. Las extracciones tanto del control positivo como el de las muestras fueron realizadas por chelex al 10%, como se ha mencionado anteriormente, degrada el ADN en función del tiempo. El control positivo fue extraído 1 mes antes de las muestras por lo que la concentración pudo haber cambiado y afectado a los resultados.

Tabla 24.

Músculo de Trucha infectado con Amphimerus en estado de metacercaria, extracción con Chelex 1, por duplicado.

Peso (mg)	Muestra (a)	Ct	Muestra (b)	Ct
1mg	MTymet CX1(a)	-	MTymet CX1(b)	-
5mg	MTymet CX1(a)	-	MTymet CX1(b)	-
10 mg	MTymet CX1(a)	24,31	MTymet CX1(b)	24,09
50 mg	MTymet CX1(a)	-	MTymet CX1(b)	42,77

Nota: (MT) músculo de trucha, (met) metacercaria, (CX1) extracción con Chelex 1, (Ct) ciclo de umbral, (a) repetición 1, (b) repetición 2.

Tabla 25.

Músculo de Trucha infectado con Amphimerus en estado de metacercaria, extracción con Chelex 2, por duplicado.

Peso (mg)	Muestra (a)	Ct	Muestra (b)	Ct
1mg	MTymet CX2(a)	23,53	MTymet CX2(b)	22,14
5mg	MTymet CX2(a)	36,00	MTymet CX2(b)	42,38
10 mg	MTymet CX2(a)	-	MTymet CX2(b)	-
50 mg	MTymet CX2(a)	-	MTymet CX2(b)	-

Nota: (MT) músculo de trucha, (met) metacercaria, (CX2) extracción con Chelex 2, (Ct) ciclo de umbral, (a) repetición 1, (b) repetición 2.

Tabla 26.

Controles utilizados en la infección de Músculo de Trucha con Amphimerus en estado de metacercaria, extracción con Chelex 1 y 2.

	Tipo de control		Ct
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (a)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus metacercaria</i> (a)	36 ng/ul	26,77
<i>Control negativo</i>	NTC (a)		-
<i>Control negativo</i>	Músculo de Trucha (b)	1 mg	-
<i>Control positivo</i>	<i>Amphimerus metacercaria</i> (b)	36 ng/ul	26,03
<i>Control negativo</i>	NTC (b)		-

Nota: (a) repetición 1, (b) repetición 2.

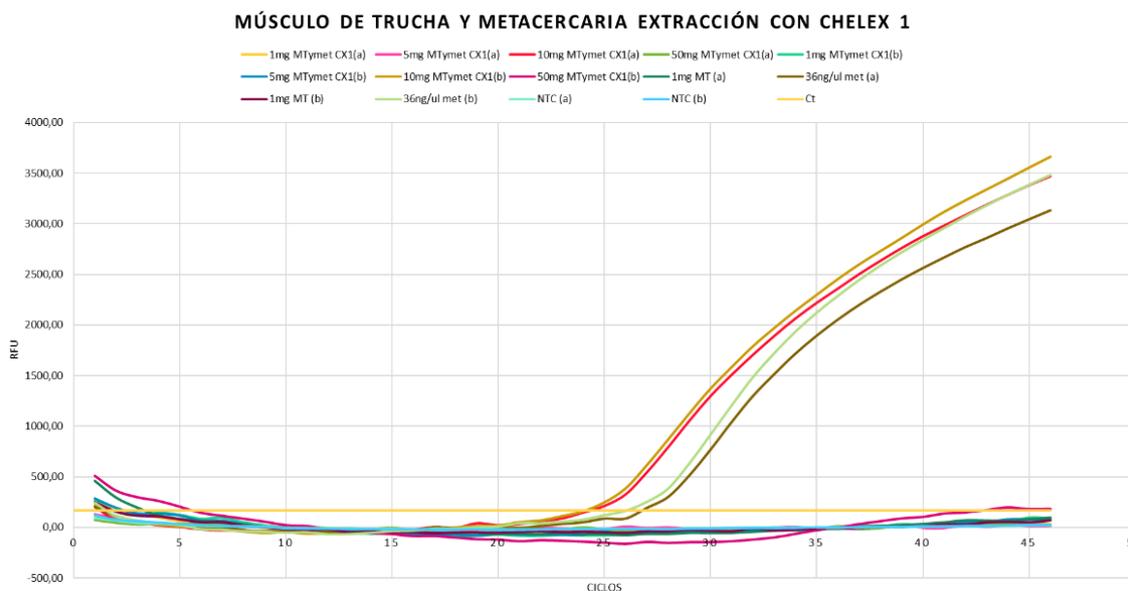


Figura 30. Amplificación de músculo de trucha infectado con *Amphimerus* en estado de metacercaria, extracción con Chelex 1.

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

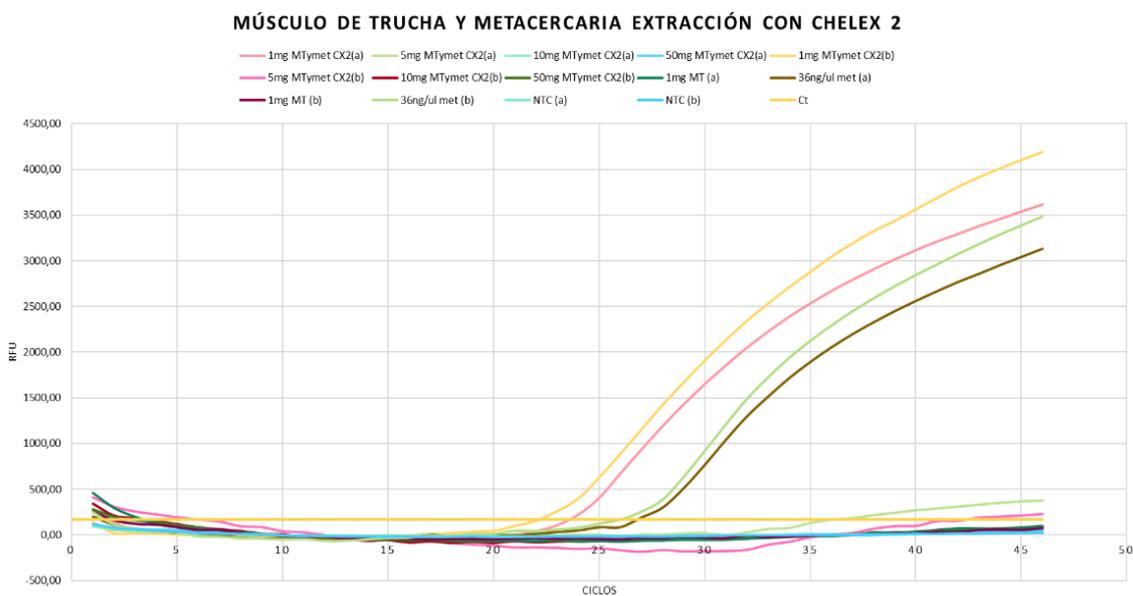


Figura 31. Amplificación de músculo de trucha infectado con *Amphimerus* en estado de metacercaria, extracción con chelex 2.

- a. RFU Unidad de fluorescencia relativa
- b. RFU (eje Y) vs. número de ciclos (eje X).
- c. NTC Control Negativo.

5.7. Cuantificación absoluta

Varias investigaciones como Rahman y colaboradores, (2011), utilizan la PCR en tiempo real absoluta para la cuantificación de huevos en muestras de heces de ratas infectadas, las ratas fueron infectadas con 1, 5, 10, 50 y 100 metacercarias y se detectó la carga de infección, después de varias semanas, por medio de la amplificación de los huevos encontrados de *Clonorchis sinensis* en las heces. Los resultados obtenidos generaron un coeficiente de correlación (R^2) de 0,96 el cual fue cercano a 1, lo que indica que los datos de la amplificación de huevos son directamente proporcionales a la cantidad de metacercarias utilizadas para la infección (Rahman, 2011). Sin embargo, se realizó un ensayo para determinar si la cuantificación absoluta era factible para la detección del número aproximado de metacercarias en una muestra. Los resultados de la cuantificación de ADN obtenido de la extracción no mantenían una correlación con el número de metacercarias por lo que no fueron directamente proporcional. Como se puede observar en la Figura 32 el coeficiente de correlación de cada repetición se encuentra muy por debajo de lo óptimo (cercano a 1), por lo que no es posible realizar la cuantificación relativa.

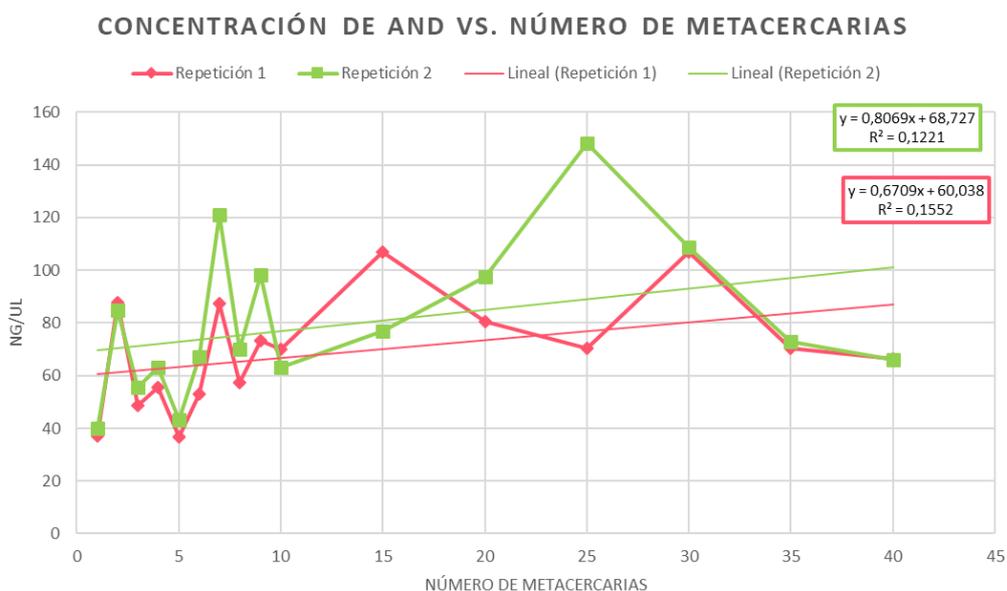


Figura 32. concentración de ADN vs. el número de metacercarias.

a. (R^2) coeficiente de correlación.

Esta variación de datos se debe a varios factores: a) el tamaño de las metacercarias no es el mismo, por lo que existen metacercarias más robustas y otras pequeñas y la cantidad de ADN no es standard, debido a que se trata de un organismo pluricelular, en el cual la cantidad de ADN es directamente proporcional al tamaño. b) Como se ha mencionado anteriormente, la microscopía es una técnica empleada para la detección y separación de metacercarias (Touch, 2009), sin embargo, la sensibilidad, eficiencia y especificidad no son aceptables. Por lo que pudo haber generado equivocaciones y confusiones, entre las metacercarias de *Amphimerus* spp. y residuos de digestión de pescados (Dung , 2014). Sin embargo, investigaciones como la de Kelly y colaboradores, (2016), realizaron la cuantificación de cercarías halladas en los intermediarios primarios mediante PCR en tiempo real. Indicaron que para la cuantificación de organismos pluricelulares es necesario realizar varias repeticiones de cada experimento y número de organismos, se recomienda realizar un mínimo de 3 repeticiones (Kelly, 2016).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La técnica de PCR en tiempo real resultó ser altamente efectiva, eficiente, sensible y eficaz para la detección del parásito *Amphimerus* spp., no solo en estado puro sino también en músculo de peces infectados y no infectados. Los resultados se obtuvieron de manera inmediata, mediante la visualización en software, por lo que elimina las técnicas post PCR como la revelación de resultados en gel de agarosa, reduciendo costos, gasto de recursos, contaminaciones, errores de pipeteo y del tipo humano. Obteniendo resultados rápidos, seguros y confiables.

Los cebadores y sonda diseñados para este proyecto resultaron ser óptimos para la identificación de la región ITS2 de *Amphimerus* spp. no solo por la sensibilidad obtenida en los ensayos, la cual fue del 100%, sino también en la especificidad ya que no se determinó amplificación en las especies de *Paragonimus* sp. y *Fasciola* sp.

Se demostró que la extracción por el método de Chelex al 10% no interfiere de manera significativa en la amplificación de las muestras de *Amphimerus* adulto, en estado de metacercaria y muestras de músculo de pescado infectadas. Resultando ser una técnica rápida, efectiva y económica. Sin embargo, el deterioro del ADN en función del tiempo de esta técnica puede afectar a la sensibilidad.

Los parámetros óptimos obtenidos del gradiente de temperatura de hibridación, denaturación y concentración de cebadores fueron de 62°C, 95°C y 0,9 µM respectivamente, las curvas de calibración indicaron una eficiencia cercana al 100% y un coeficiente de correlación cercano a 1. Sin embargo, a pesar de la obtención de los parámetros óptimos por medio de la estandarización, se determinó mediante de un análisis estadístico que no existen diferencias significativas entre los resultados ($P > 0,05$). Por lo que se puede concluir que

los ensayos realizados entre los rangos establecidos generan resultados positivos.

La PCR en tiempo real ha demostrado tener una sensibilidad mayor a las técnicas de microscopía, la sensibilidad obtenida en este proyecto indicó que la técnica es óptima para determinar un mínimo de una metacercaria ya sea en estado puro o en conjunto con músculo de pez de hasta 50mg. También se determinó la sensibilidad de la técnica en contracción mínima de ADN, la cual fue de 0,05 ng/ μ l, lo que indica que es altamente sensible para la detección de metacercarias en músculo de pez ya que la concentración de ADN es mayor al mínimo obtenido. Finalmente, la sensibilidad total de las muestras fue del 100% para cada uno de los ensayos con distintos pesos y cantidades de músculo de pez.

Se determinó que el estadio del trematodo de vías biliares *Amphimerus* spp., ya sea adulto o metacercaria no afecta a la sensibilidad, eficiencia y especificidad de la técnica, por lo que es seguro su utilización en cualquier estadio ya sea de huevo, larvario o adulto.

Los ensayos no solo determinaron la sensibilidad de la técnica, sino también una especificidad del 100%, ya que las pruebas con *Paragonimus* sp. y *Fasciola* sp. resultaron negativas. Lo cual agrega validez a la técnica, debido a que las tres especies se encuentran cercanas en las mismas zonas endémicas. Lo que asegura que la amplificación obtenida representa únicamente a *Amphimerus* spp.

A pesar de que se utiliza una técnica molecular cuantitativa, no se pudo cuantificar el número de metacercarias de cada muestra debido a las irregularidades obtenidas en la separación de metacercarias por medio de microscopía y la concentración de ADN de cada ensayo, el coeficiente de correlación resultó por debajo de lo óptimo ($R^2 < 1$) en más de un 90%, por lo que se puede concluir que la cuantificación de metacercarias no es posible mediante este conjunto de métodos.

6.2. Recomendaciones

La temperatura y gradiente de cebadores son los óptimos para esta técnica, sin embargo, se recomienda realizar pruebas previo a la utilización de este protocolo, ya que se debe tomar en cuenta que los resultados obtenidos fueron a 2800 msnm por lo que las condiciones atmosféricas son distintas a las encontradas a nivel del mar.

Se recomienda el uso de los cebadores y sonda para otras variantes de la PCR como la PCR en punto final y RT-PCR en tiempo real, debido a su alta especificidad para detección de la región *ITS2* de *Amphimerus* spp.

Se recomienda el uso de la técnica molecular PCR en tiempo real para la identificación de *Amphimerus* spp. de peces de agua dulce. Debido a su alta especificidad, sensibilidad y eficacia.

Se recomienda tomar en cuenta los parámetros de la curva de calibración antes de realizar cualquier ensayo cuantitativo o prueba en muestras, ya que indica la eficiencia de la técnica y los parámetros utilizados.

Si los resultados son negativos, se recomienda realizar una dilución de ADN a 10 ng/μl previo a su prueba para determinar si la muestra es negativa de manera más exacta.

Para la separación de metacercarias por medio de microscopía, debe tomarse la precaución de asegurarse que las metacercarias pertenezcan a *Amphimerus* spp. y que se encuentren en el tubo a extraer, para evitar pérdidas de resultados.

Se recomienda el uso de esta técnica para la detección de huevos de *Amphimerus* spp. en muestras de heces humanas como método de diagnóstico y la cuantificación de la posible carga infectiva.

También se recomienda el uso, para la detección de los diferentes estadios larvarios de *Amphimerus* spp. en los primeros intermediarios de su ciclo vital (moluscos) como los caracoles de agua dulce, para la incriminación de especies intermediarias tanto primarias como secundarias.

Es recomendable el uso en estudios epidemiológicos para determinar los tipos y especies de vectores como peces y moluscos de *Amphimerus* spp. y la creación de mapas de amphimeriasis en ecosistemas parecidos al del Río Cayapas, provincia de Esmeraldas y en el cantón Jipijapa, Provincia de Manabí. Para establecer de forma precisa las áreas endémicas y afectadas por este trematodo hepático.

Se recomienda el uso de esta técnica en la vigilancia epidemiológica y ecológica para conocer estadios específicos del ciclo de vida en los huéspedes primarios y secundarios. Esto podría ayudar a determinar la emergencia y reemergencia de esta enfermedad en zonas previamente tratadas o no infectadas.

REFERENCIAS

- Abreu, J. M. (2014). *Emergent and re-emergent diseases, a theme of concern for everybody*. *Revista Médica Electrónica*, 36(5). Recuperado el 7 de Julio de 2018 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242014000500001
- Amaro, D. E., Cowell, A., Tuohy, M. J., Procop, G. W., Morhaime, J., y Reed, S. L. (2016). Cerebral Paragonimiasis Presenting with Sudden Death. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6), 1424–1427. Doi: 10.4269/ajtmh.15-0902
- Bahr, N. C., Trotman, R. L., Samman, H., Jung, R. S., Rosterman, L. R., Weil, G. J., y Hinthorn, D. R. (2017). Eosinophilic Meningitis Due to Infection With *Paragonimus kellicotti*. *Clinical Infectious Diseases*, 64(9), 1271–1274. Doi: 10.1093/cid/cix102
- Baker-Austin, C., Trinanés, J., González-Escalona, N., y Martínez-Urtaza, J. (2017). Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends in Microbiology*, 25(1), 76–84. Doi: 10.1016/j.tim.2016.09.008
- Bargues, M. D., Gayo, V., Sanchis, J., Artigas, P., Khoubbane, M., Birriel, S., y Mas-Coma, S. (2017). DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005352. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005352
- Bergeron, M., Lustyik, G., Phaneuf, S., Ding, T., Nicholson, J. K. A., Janossy, G., ... Mandy, F. (2003). Stability of currently used cytometers facilitates the identification of pipetting errors and their volumetric operation: “Time” can tell all. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 52B(1), 37–39. Doi: 10.1002/cyto.b.10014

- Bhattacharya, S., y Azim, S. (2018). Neglected Tropical Diseases. *KJ Gastro*.
Doi: 10.31872/2018/KJG-100107
- Bogitsh, B., Carter, C., y Oeltmann, O. (2012). *Human Parasitology*. (Elsevier, Ed.) (4th ed.). Waltham, Estados Unidos de América: Elsevier.
- Bowman, D. (2008). *Feline Clinical Parasitology*. (J. W. y Sons., Ed.). Iowa, Estados Unidos de América: John Wiley y Sons. Doi: 0.1002/9780470376805
- Bowman, D. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (Elsevier, Ed.) (10th ed.). Nueva York, Estados Unidos de América: Elsevier.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., y Wittwer, C. T. (2009). *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611 LP-622. Doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Byrne, A. W., Graham, J., McConville, J., Milne, G., McDowell, S., Hanna, R. E. B., y Guelbenzu-Gonzalo, M. (2018). *Seasonal variation of Fasciola hepatica antibodies in dairy herds in Northern Ireland measured by bulk tank milk ELISA*. *Parasitology Research*, 117(9), 2725–2733. Doi: 10.1007/s00436-018-5961-0
- Cabesas-Sánchez, C. (2015). Enfermedades infecciosas emergentes-reemergentes y sus determinantes. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*.
- Cai, X.-Q., Yu, H.-Q., Li, R., Yue, Q.-Y., Liu, G.-H., Bai, J.-S., ... Zhu, X.-Q. (2014). *Rapid Detection and Differentiation of Clonorchis sinensis and Opisthorchis viverrini Using Real-Time PCR and High Resolution Melting Analysis*. *The Scientific World Journal*, 2014, 6 pages. Recuperado el 6 de Septiembre de 2018 de <https://doi.org/ID 893981>
- Calvopiña, M., Cevallos, W., Atherton, R., Saunders, M., Small, A., Kumazawa, H., y Sugiyama, H. (2015). *High prevalence of the liver fluke Amphimerus sp. in domestic cats and dogs in an area for human*

amphimeriasis in Ecuador. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(2).
Doi: 10.1371/journal.pntd.0003526

Calvopiña, M., Cevallos, W., Kumazawa, H., y Eisenberg, J. (2011). High prevalence of human liver infection by *Amphimerus* spp. flukes, Ecuador. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2331–2334. Doi: 10.3201/eid1712.110373

CDC. (2016a). Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Recuperado el 3 de Enero de 2019 de <https://www.cdc.gov/spanish/index.html>

CDC (2016). *Division of Parasitic Diseases*. Recuperado el 11 de Diciembre de 2018 de <https://www.cdc.gov/parasites/es/about.html>

Cevallos. (2017). *Coinfection of Leishmania guyanensis and Human Immunodeficiency Virus–Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1151–1154. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0431

Cevallos, W., Fernández-Soto, P., Calvopiña, M., Buendía-Sánchez, M., López-Abán, J., Vicente, B., y Muro, A. (2018). *Diagnosis of amphimeriasis by LAMP_{Amphimerus} assay in human stool samples long-term storage onto filter paper. PloS One*, 13(2). Doi: 10.1371/journal.pone.0192637

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 299–305.

de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., y de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using “Chelex 100” suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*, 143(8), 785–790. Doi: 10.1016/0923-2508(92)90107-Y

de Wit, L. A., Croll, D. A., Tershy, B., Newton, K. M., Spatz, D. R., Holmes, N. D., y Kilpatrick, A. M. (2017). *Estimating Burdens of Neglected Tropical Zoonotic Diseases on Islands with Introduced Mammals. The American*

Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 96(3), 749–757. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0573

Doenhoff, M. J., Cioli, D., y Utzinger, J. (2008). *Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. Recuperado el 18 de Junio de 2018 de https://journals.lww.com/coinfectiousdiseases/Fulltext/2008/12000/Praziquantel__mechanisms_of_action,_resistance_and.13.aspx

Dung, V. T., Waikagul, J., Thanh, B. N., Vo, D. T., Nguyen, D. N., y Murrell, K. D. (2014). Endemicity of *Opisthorchis viverrini* liver flukes, Vietnam, 2011-2012. *Emerging Infectious Diseases*. Doi: 10.3201/eid2001.130168

Emelianov, V., Skvortsova, T., Mikhailova, L., y Shamitova, E. (2016). *Serum Antibody Ig G and Ig M Titers for Opisthorchis felinus Correlate with Eggs in Faeces - a Comprehensive Study in Chuvash Republic, Russia*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17. Doi: 10.7314/apjcp.2016.17.1.281

Estrada-García, M., y García-Prieto, L. (2014). *Description of a new species of Pseudopecoelus (Trematoda: Opecoelidae) with new records of trematodes of marine fishes from the Pacific coast of Mexico*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Doi: 10.22201/ib.20078706e.2018.1.1942

Evans, W. S. (1963). *Amphimerus pseudofelinus and its second lintermediate in Manitoba*. *Canadian Journal of Zoology*, 41(4), 649–651. Doi: 10.1139/z63-037

Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W., y Solomon, A. W. (2010). *Neglected tropical diseases*. *British Medical Bulletin*, 93(1), 179–200. Doi: 10.1093/bmb/ldp046

Fürst, T., Keiser, J., y Utzinger, J. (2012). *Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis*. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3), 210–221. Doi: 10.1016/S1473-3099(11)70294-8

- Godfroid, J. (2017). *Brucellosis in livestock and wildlife: zoonotic diseases without pandemic potential in need of innovative one health approaches*. *Archives of Public Health = Archives Belges de Sante Publique*, 75, 34. Doi: 10.1186/s13690-017-0207-7
- Grencis, R. K. (2015). *Immunity to Helminths: Resistance, Regulation, and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes*. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 201–225. Doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120218
- Greter, H., Batil, A. A., Ngandolo, B. N., Alfaroukh, I. O., Moto, D. D., Hattendorf, J., y Zinsstag, J. (2017). Human and livestock trematode infections in a mobile pastoralist setting at Lake Chad: added value of a One Health approach beyond zoonotic diseases research. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 111(6), 278–284. Doi: 10.1093/trstmh/trx051
- Guevara Espinosa, Á. G., y Rueda Vera, A. E. (2016). Producción de antígenos excreción/secreción de parásitos adultos *Amphimerus* spp., y el desarrollo de Western blot para el diagnóstico de infección de humanos. Universidad Central Del Ecuador. Recuperado el 7 de Octubre de 2018 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10962>
- Heeney, J. L. (2006). *Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and prevention*. *Journal of Internal Medicine*, 260(5), 399–408. Doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01711.x
- Hernández, J. E. H., Ronquillo, J. C. C., del Carmen Rodríguez Castillo, J., Robles, J. M. R., y Castañeda, E. L. R. (2018). Existencia de fasciolosis ovina y caprina que afectan la producción en San José Chiapa, Puebla. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Recuperado el 7 de Noviembre de 2018 de <http://ageconsearch.umn.edu/record/275177>
- Hortal, M. (2016). Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes: información actualizada. *Revista Médica Del Uruguay*, 32, 52–58.

Recuperado el 20 de Septiembre de 2018 de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1688-03902016000100007

- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., y Naghavi, M. (2014). *The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2865. Doi: 10.1371/journal.pntd.0002865
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., y Periago, M. R. (2008). *The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e300. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000300
- Hotez, P. J., Fenwick, A., Ray, S. E., Hay, S. I., y Molyneux, D. H. (2018). *“Rapid impact” 10 years after: The first “decade” (2006–2016) of integrated neglected tropical disease control*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(5), e0006137. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006137
- Hotez, P. J., Pecoul, B., Rijal, S., Boehme, C., Aksoy, S., Malecela, M., y Reeder, J. C. (2016). *Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0003895. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003895
- Jittiyawadee Sripa, Nadda Kiatsopit, S. P. (2016). *Prevalence of trematode larvae in intermediate hosts: snails and fish in ko ae sub-district of Khueang nai, Ubon Ratchathani province, Thailand*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 47(3), 1–11. Recuperado el 7 de Agosto de 2018 de <http://www.thaiscience.info/journals/Article/TMPH/10983727.pdf>
- Johansen, M. V., Lier, T., y Sithithaworn, P. (2015). *Towards improved diagnosis of neglected zoonotic trematodes using a One Health*

- approach. *Acta Tropica*, 141, 161–169. Doi: 10.1016/j.actatropica.2013.07.006
- Johansson, B. G. (1972). *Agarose Gel Electrophoresis. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 7–19. Doi: 10.3109/00365517209102747
- Kaewkong, W., Intapan, P. M., Sanpool, O., Janwan, P., Thanchomnang, T., Laummaunwai, P., y Maleewong, W. (2013). *Molecular differentiation of Opisthorchis viverrini and Clonorchis sinensis eggs by multiplex real-time PCR with high resolution melting analysis. The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 689–694. Doi: 10.3347/kjp.2013.51.6.689
- Keiser, J., y Utzinger, J. (2005). *Emerging foodborne trematodiasis. Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1507–1514. Doi: 10.3201/eid1110.050614
- Kelly N. Markowitz, Jason D. Williams, M. K. K. (2016). *Development of quantitative PCR assay for detection of the trematode parasite Proctoeces maculatus in the blue mussel Mytilus edulis. Diseases of aquatic organisms*, 122, 125–136. Doi: 10.3354/dao03072
- Kenneth J.Livak, T. D. S. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods*, 25(4), 402–408. Doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Kim, E.-M., Kim, J.-L., Choi, S. Y., Kim, J.-W., Kim, S., Choi, M.-H., y Hong, S.-T. (2008). *Infection status of freshwater fish with metacercariae of Clonorchis sinensis in Korea. The Korean Journal of Parasitology*, 46(4), 247–251. Doi: 10.3347/kjp.2008.46.4.247
- Kim, T. I., Yoo, W. G., Kwak, B. K., Seok, J.-W., y Hong, S.-J. (2011). *Tracing of the Bile-chemotactic migration of juvenile Clonorchis sinensis in rabbits by PET-CT. PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12). Doi: 10.1371/journal.pntd.0001414
- Kim, Y. H. (1999). *Pancreatitis in association with Clonorchis sinensis infestation: CT evaluation. American Journal of Roentgenology*, 172(5),

1293–1296. Doi: 10.2214/ajr.172.5.10227505

- Kotowski, N., Jardim, R., y Dávila, A. M. R. (2015). *Improved orthologous databases to ease protozoan targets inference*. *Parasites y Vectors*, 8, 494. Doi: 10.1186/s13071-015-1090-0
- Kuri-Morales, P., Guzmán-Morales, E., y De La Paz-Nicolau, E. (2015). Enfermedades emergentes y reemergentes. *Gaceta Médica Mexicana*.
- Lamaningao, P., Kanda, S., Laimanivong, S., Shimono, T., AW, D., Phyaluenglath, A., y Nishiyama, T. (S.F). *Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (Opisthorchis and Haplorchis) Infections in Human Stools*. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0165
- Lamaningao, P., Kanda, S., Laimanivong, S., Shimono, T., Darcy, A. W., Phyaluenglath, A., y Nishiyama, T. (2017). *Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (Opisthorchis and Haplorchis) Infections in Human Stools*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 221–228. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0165
- Le, T. H., Van De, N., Blair, D., Sithithaworn, P., y McManus, D. P. (2006). *Clonorchis sinensis and Opisthorchis viverrini: Development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination*. *Experimental Parasitology*, 112(2), 109–114. Doi: 10.1016/j.exppara.2005.09.012
- Liese, B. H., y Schubert, L. (2009). *Official development assistance for health—how neglected are neglected tropical diseases? An analysis of health financing*. *International Health*, 1(2), 141–147. Doi: 10.1016/j.inhe.2009.08.004
- Lin, Y., Jia, Q., y Fu, Y. (2018). *Hepatic Paragonimiasis Mimicking Hepatocellular Carcinoma*. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 22(3). Doi: 10.1007/s11605-018-3683-3
- M. Schilling, T. Maiwald, S. Bohl, M. Kollmann, C. Kreutz, J. Timmer, U. K. (2005). *Quantitative data generation for systems biology: the impact of*

randomisation, calibrators and normalisers. IEE Proceedings - Systems Biology, 152(4), 193–200. Doi: 10.1049/ip-syb_20050044

Mackey, T. K., Liang, B. A., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K. C., y Lee, D. E. (2014). *Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. Clinical Microbiology Reviews, 27(4), 949–979. Doi: 10.1128/CMR.00045-14*

Maleewong, W., Intapan, P. M., Wongkham, C., Wongsaroj, T., Kowsuwan, T., Pumidonming, W., y Kitikoon, V. (2003). *Detection of Opisthorchis viverrini in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method. Parasitology, 126(1), 63–67. Doi: 10.1017/S0031182002002573*

Michael Horgan. (2002). *Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9), e36–e36. Doi: 10.1093/nar/30.9.e36*

Molyneux, D. H., Savioli, L., y Engels, D. (2017). *Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. The Lancet, 389(10066), 312–325. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)30171-4*

Moon, E.-K., Lee, S.-H., Goo, T. W., y Quan, F.-S. (2018). *Immune responses induced by co-infection with Capillaria hepatica in Clonorchis sinensis-infected rats. Journal of Helminthology, 92(4), 395–402. Doi: 10.1017/S0022149X17000682*

Onsurathum S., Pinlaor P., Charoensuk L., Haonon O., Chaidee A., Intuyod K., Laummaunwai P., Boonmars T., Kaewkes P., Somchai, S.(2016). *Contamination of Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui metacercariae in fermented fish products in northeastern Thailand markets. Food Control, v. 59, 6-498–2016 v.59. Doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.020*

Onsurathum, S., Pinlaor, P., Charoensuk, L., Haonon, O., Chaidee, A., Intuyod,

- K., y Pinlaor, S. (2016). *Contamination of Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui metacercariae in fermented fish products in northeastern Thailand markets*. *Food Control*, 59, 493–498. Doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.020
- Palomino-Camargo, C., y Gonzalez-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535–546. Recuperado el 7 de Septiembre de 2018 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020ynrm=iso
- Parvathi, A., Umesha, K. R., Kumar, S., Sithithaworn, P., Karunasagar, I., y Karunasagar, I. (2008). *Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of Opisthorchis viverrini in fish*. *Acta Tropica*, 107(1), 13–16. Doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.001
- Pfaffl, M. W. (2001). *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45–e45. Doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., y Dempfle, L. (2002). *Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36–e36. Doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Promega. (2018). *GoTaq® Probe qPCR Master Mix*. (Promega, Ed.). Madison: Promega. Recuperado el 17 de Agosto de 2018 de www.promega.com
- Pulido-Flores, G., Monks, S., Falcón-Ordaz, J., y Violante-González, J. (2015). Helminths parasites of fauna silvestre in the Coasts of Guerrero, Oaxaca and Chiapas, México. In *Estudios en biodiversidad* (pp. 52–77).
- Rahman, S. M., Bae, Y. M., Hong, S. T., y Choi, M. H. (2011). *Early detection and estimation of infection burden by real-time PCR in rats experimentally infected with Clonorchis sinensis*. *Parasitology*

Research, 109(2), 297–303. Doi: 10.1007/s00436-011-2253-3

- Schmid, B. V., Büntgen, U., Easterday, W. R., Ginzler, C., Walløe, L., Bramanti, B., y Stenseth, N. C. (2015). *Climate-driven introduction of the Black Death and successive plague reintroductions into Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201412887. Doi: 10.1073/pnas.1412887112
- Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols*, 3, 1101. Doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Scientific, T. (2014). *Real-time PCR handbook*. (ThermofisherScientific, Ed.) (10th ed.). Nueva York, Estados Unidos de América: ThermofisherScientific.
- Seyoum, Z., Tadesse, T., y Addisu, A. (2015). *Ectoparasites Prevalence in Small Ruminants in and around Sekela, Amhara Regional State, Northwest Ethiopia.* *Journal of Veterinary Medicine*, 2015. Doi: 10.1155/2015/216085
- Shuohan Zheng, Y. Z. (2016). *Liver fluke infection and cholangiocarcinoma. Parasitology Research*, 116(1), 11–19. Doi: 10.1007/s0043
- Sithithaworn, P., Yongvanit, P., Duenngai, K., Kiatsopit, N., y Pairojkul, C. (2014). *Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(5), 301–308. Doi: 10.1002/jhbp.62
- Solomon, E., Berg, L., y Martin, D. (2008). *Biología*. (T. Marco y C. Heras, Eds.) (Octava). Mexico DF, México: McGraw-Hill.
- Sukontason, K., Piangjai, S., Muangyimpong, Y., Sukontason, K., y Methanitikorn, R. (1997). *Prevalence of trematode metacercariae in cyprinoid fish of Ban Pao district, Chiang Mai Province, northern Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*.

- Thatcher, V. (1911). *The Genus Amphimerus Barker, 1911 (Trematoda: Opisthorchiidae) in Colombia with the Description of a New Species*. The Helminthological Society of Washington.
- Touch, S., Komalamisra, C., Radomyos, P., y Waikagul, J. (2009). *Discovery of Opisthorchis viverrini metacercariae in freshwater fish in southern Cambodia*. *Acta Tropica*, 111(2), 108–113. Doi: 10.1016/j.actatropica.2009.03.002
- Valenzuela, J. G., y Aksoy, S. (2018). Impact of vector biology research on old and emerging neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(5), Doi: 10.1371/journal.pntd.0006365
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., y Hellens, R. P. (2007). *Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs*. *Plant Methods*, 3(1), 12. Doi: 10.1186/1746-4811-3-12
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., y Higuchi, R. (1991). *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*. *BioTechniques*, 10(4), 506–513. Recuperado el 12 de Septiembre de 2018 de <http://europepmc.org/abstract/MED/1867860>
- Webster, J. P., Gower, C. M., Knowles, S. C. L., Molyneux, D. H., y Fenton, A. (2016). *One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases*. *Evolutionary Applications*, 9(2), 313–333. Doi: 10.1111/eva.12341
- WHO. (2010). Obtenido de Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes. Recuperado el 28 de Septiembre de 2018 de https://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/index5.html
- Xian Q., Caiabc H., Qiong Y., Jian S., Baie J., Dong T., Xu C., Huf D., Hu C., Ren L., Zhang M., Xin C., Liz A., y Xing Q. (2012). *Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of Clonorchis sinensis DNA in human stool samples and fishes*. *Parasitology International*, 61(1), 183–186. Recuperado el 18 de Diciembre de 2018

de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576911000808?via%3Dihub>

- Yan, C., Wang, L., Li, B., Zhang, B.-B., Zhang, B., Wang, Y.-H., y Zheng, K.-Y. (2015). *The expression dynamics of transforming growth factor- β /Smad signaling in the liver fibrosis experimentally caused by Clonorchis sinensis*. *Parasites y Vectors*, 8, 70. Doi: 10.1186/s13071-015-0675-y
- Zaiss, M. M., Rapin, A., Lebon, L., Dubey, L. K., Mosconi, I., Sarter, K., y Harris, N. L. (2015). *The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation*. *Immunity*, 43(5), 998–1010. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.012
- Zemmer, S. A., Wyderko, J., Neto, J. D. S., Cedillos, I., Clay, L., Benfield, E. F., y Belden, L. K. (2017). *Seasonal and Annual Variation in Trematode Infection of Stream Snail Elimia proxima in the Southern Appalachian Mountains of Virginia*. *Journal of Parasitology*, 103(3), 213–221. Recuperado el 8 de Enero de 2019 de <https://doi.org/10.1645/16-82>

