



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Entamoeba spp.* EN POBLACIONES
INFANTILES DE LA COSTA, SIERRA Y ORIENTE DEL ECUADOR
ENTRE LOS 10 y 14 AÑOS DE EDAD MEDIANTE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA

Autora

Daniela Alejandra Muñoz Tapia

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Entamoeba spp.* EN POBLACIONES
INFANTILES DE LA COSTA, SIERRA Y ORIENTE DEL ECUADOR
ENTRE LOS 10 y 14 AÑOS DE EDAD MEDIANTE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA

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

Profesor guía

Ph.D. Fabio Marcelo Idrovo Espín

Autora

Daniela Alejandra Muñoz Tapia

Año

2018

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Detección molecular de *Entamoeba spp.* en poblaciones infantiles de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador entre los 10 y 14 años de edad mediante reacción en cadena de la polimerasa, a través de reuniones periódicas con la estudiante Daniela Alejandra Muñoz Tapia en el semestre 2018-1 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”.

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)

C.I. 1705952255

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Detección molecular de *Entamoeba spp.* en poblaciones infantiles de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador entre los 10 y 14 años de edad mediante reacción en cadena de la polimerasa, de Daniela Alejandra Muñoz Tapia, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Doctor en Agrobiotecnología

C.I. 1716829666

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Ana Lucía Ruano Nieto

Doctora en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

C.I. 1710090604

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.

Daniela Alejandra Muñoz Tapia

C.I. 1722659495

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Vivian Morera por su apoyo incondicional durante el trabajo, así como también por sus enseñanzas diarias durante mi carrera universitaria.

Asimismo, agradezco a la Dra. Ana Lucía Ruano por vincularme en el proyecto PROPAD y ocupar sus instalaciones para realizar esta investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo le dedico a Margarita Tapia mi hermosa madre, por el apoyo incondicional que me ha brindado desde el comienzo hasta el final de mi carrera universitaria. Por sus consejos y ánimos en momentos difíciles. Este trabajo es para ella y por ella.

RESUMEN

La amebiasis es una enfermedad parasitaria gastrointestinal producida con mayor frecuencia por *Entamoeba histolytica*, principal protozooario capaz de invadir la mucosa del intestino y provocar infecciones. Alrededor de cinco especies de *Entamoeba* residen en el lumen intestinal como comensales: *E. coli*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki* y *E. hartmanni*; de éstas las dos primeras y *E. histolytica* son las más prevalentes. En Ecuador, se han realizado estudios epidemiológicos de *Entamoeba spp.* en comunidades rurales, sin embargo, aún hay escasa información que refleje la real prevalencia de estos parásitos debido a que los estudios se han basado mayoritariamente en el uso de microscopía directa para el diagnóstico. Esta metodología con baja especificidad y sensibilidad para la diferenciación de especies morfológicamente idénticas, ha permitido la denominación de estos parásitos como “complejo de especies”. Actualmente, el desarrollo de técnicas moleculares permite realizar estudios epidemiológicos de estos microorganismos, entre ellas las técnicas basadas en la detección de su ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han aportado información valiosa para descifrar la prevalencia de este género. El presente trabajo pretende determinar la presencia de *Entamoeba spp.* en escolares de las tres regiones del Ecuador continental, mediante el uso de PCR punto final en base a cebadores específicos de género como técnica diagnóstica, en 508 muestras de heces de niños y niñas de edades entre los 10 y 14 años, en comparación con la detección de *Entamoeba spp.* mediante microscopía directa. Los resultados mostraron un 41,5% de prevalencia de *Entamoeba spp.* en las tres regiones ecuatorianas donde el Oriente mantenía 52,6 % seguido de la Sierra con 41,9 % y la Costa con 26,2 %. Se identificó que la PCR obtuvo una sensibilidad del 55.3% y una especificidad del 64.3%. El análisis de los resultados concluyó que *Entamoeba spp.* es altamente prevalente en el Ecuador. Además, se determinó que la microscopía, estándar de referencia actualmente utilizado en Ecuador para la detección de *Entamoeba spp.* no proporcionó rangos óptimos de sensibilidad y especificidad

ABSTRACT

Amebiasis is a gastrointestinal parasitic disease most frequently produced by *Entamoeba histolytica*, the main protozoan that can invade the intestinal mucosa and cause infections. About five species of *Entamoeba* reside in the intestinal lumen as commensals: *E. coli*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki* and *E. hartmanni*; of these the first two and *E. histolytica* are the most prevalent. In Ecuador, there have been epidemiological studies of *Entamoeba spp.* in rural communities; however, there is still scarce information that reflects the real prevalence of these parasites because the studies have been based mostly on the use of direct microscopy for diagnosis. This methodology with low specificity and sensitivity for the differentiation of morphologically identical species, has allowed the denomination of these parasites as "species complex". Currently, the development of molecular techniques allows epidemiological studies of these microorganisms, including techniques based on the detection of their DNA as the polymerase chain reaction (PCR), which have provided valuable information to decipher the prevalence of this genre. The present work aims to determine the presence of *Entamoeba spp.* in schoolchildren from the three regions of continental Ecuador, by using endpoint PCR based on gender-specific primers as a diagnostic technique in 508 stool samples of boys and girls between 10 and 14 years of age, compared with screening of *Entamoeba spp.* through direct microscopy. The results showed a 41.5% prevalence of *Entamoeba spp.* in the three Ecuadorian regions where the East maintained 52.6% followed by the Sierra with 41.9% and the Coast with 26.2%. It was identified that the PCR obtained a sensitivity of 55.3% and a specificity of 64.3%. The analysis of the results concluded that *Entamoeba spp.* it is highly prevalent in Ecuador. It was also determined that microscopy, reference standard currently used in Ecuador for the detection of *Entamoeba spp.*, did not provide optimal ranges of sensitivity and specificity.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	7
1.3 Justificación	9
1.4 Objetivos.....	10
1.4.1 Objetivo General.....	10
1.4.2 Objetivos Específicos.....	10
2. Capítulo II. Marco teórico	11
2.1 Amebas.....	11
2.2 <i>Entamoeba spp.</i>	12
2.3 Clasificación de especies de <i>Entamoeba spp.</i>	12
2.4 Hospedero.....	18
2.5 Reproducción	18
2.6 Transmisión (Vector)	19
2.7 Ciclo de Vida	19
2.8 Factores de virulencia de <i>Entamoeba histolytica</i>	20
2.9 Patogénesis	22
2.10 Causas de la Amebiasis	23
2.11 Epidemiología	24
2.12 Métodos de diagnóstico.....	25
2.13 Mecanismo de defensa del hospedero	25
2.14 Tratamiento	28
2.15 Medidas de prevención y control.....	29
3. Capítulo III. Metodología.....	31
3.1 Determinación de la población y muestra	31
3.2 Identificación de puntos estratégicos.....	32

3.3 Aspectos Bioéticos y Sociales.....	33
3.4 Etapa de biología molecular	34
3.4.1 Lavados de muestras de heces	34
3.4.2 Extracción de ADN de muestras de heces	34
3.4.3 Cuantificación del ADN.....	36
3.4.4 Amplificación de fragmentos de la subunidad ribosomal menor de <i>Entamoeba spp.</i> con cebadores de género	36
3.5 Análisis de la amplificación	38
3.6 Selección de las muestras positivas de <i>Entamoeba spp.</i>	38
3.7 Análisis estadístico.....	38
3.7.1 Prevalencia aparente y real	38
3.7.2 Sensibilidad y Especificidad.....	39
3.7.3 Prueba de McNemar.....	40
3.8 Planteamiento de hipótesis	40
4. Capítulo IV. Resultados y discusión.....	41
4.1 Análisis de frecuencia de variables.....	41
4.2 Amplificación del fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor de <i>Entamoeba spp.</i> mediante PCR punto final	42
4.3 Diagnóstico por PCR.....	43
4.4 Diagnóstico por microscopía	44
4.5 Correlación entre el criterio morfológico por microscopía y amplificación por PCR.....	45
4.6 Prevalencia aparente de <i>Entamoeba spp.</i> determinada por la amplificación del gen que codifica para la secuencia de la subunidad ribosomal menor de <i>Entamoeba spp.</i>	48
5. Conclusiones y recomendaciones	52
5.1 Conclusiones.....	52
5.2 Recomendaciones	52
Referencias.....	54
ANEXOS	63

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

El género *Entamoeba* abarca a un grupo de organismos protozoarios unicelulares de vida libre, que poseen un modo de locomoción ameboidea (Fox et al., 2006), descrito como un movimiento llevado a cabo por una célula frente a un determinado entorno (Hall & Guyton, 2007). Dentro de este género existen seis especies que habitan el intestino grueso del ser humano: *E. dispar*, *E. histolytica*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. hartmanni* y *E. coli*. Gran parte de las especies de este género son no patogénicas para el ser humano, sin embargo, *Entamoeba histolytica* ha sido estudiada debido a su patogenicidad (Ngu et al., 2012).

La Organización Panamericana de la Salud en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, han establecido el concepto de amebiasis intestinal como una infección provocada por *Entamoeba histolytica*. Este parásito puede penetrar la mucosa del intestino delgado e intestino grueso y provocar en el ser humano cuadros de colitis amébrica, abscesos hepáticos o en casos extremos infecciones, puede llegar a diseminarse de manera sistémica hacia órganos distantes como el cerebro (Pritt & Clark, 2008).

Alrededor de 50 millones de individuos en el mundo se encuentran infectados por este parásito causando una alta tasa de mortalidad y morbilidad especialmente en niños y ancianos (Nozaki & Bhattacharya, 2015). Dependiendo del sistema inmunitario del huésped, la infección puede presentarse meses o incluso años después de la exposición. Considerando que la prevalencia es el número de individuos que, en relación con la población total, padecen una enfermedad determinada en un momento específico (Moreno-Altamirano, López-Moreno, & Corcho-Berdugo, 2000), las especies de *Entamoeba* poseen una alta prevalencia mundial en especial en países con condiciones sanitarias y económicas deficientes, evidenciándose el contagio

por el consumo de alimentos o agua contaminada con quistes. La presencia de amebiasis intestinal en países desarrollados se presenta mayoritariamente en turistas o inmigrantes que provienen de áreas endémicas (Pritt & Clark, 2008).

Entamoeba histolytica corresponde a uno de los parásitos protozoarios más estudiados en la actualidad por su patogenicidad y su similitud morfológica con la especie *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* (Pérez-Arellano, Carranza-Rodríguez, Vicente-Santiago, & Muro, 2010).

Se ha determinado que el único hospedero de *E. histolytica* es el hombre, aunque hay posibilidad de una transmisión zoonótica mínima. Se ha encontrado que los perros pueden ser medios de transmisión de infecciones en el ser humano cuando ingieren las heces del hospedero (coprofagia), sin embargo, no resultaría en una zoonosis riesgosa por efecto de que *E. histolytica* no enquistada en los perros (Thompson y Smith, 2011). Las moscas se han identificado como posibles vectores de los quistes de *Entamoeba* (Acha y Szyfres, 2003).

Entamoeba spp. pasa por dos fases de desarrollo: una vegetativa a través de la cual se da la formación del trofozoito y una fase denominada quística o de resistencia, donde se generan los quistes (Acha y Szyfres, 2003). Los trofozoitos no juegan un papel en la transmisión de amebiasis intestinal y aunque, gran parte de ellos viven dentro del lumen intestinal como comensales sin causar un efecto grave sobre el huésped, son ellos los causantes de provocar ciertos daños sobre los tejidos del intestino cuando el ambiente es propicio para su desarrollo. Los quistes son las formas infectantes del parásito las cuales tienden a sobrevivir ante las variaciones de pH en el estómago, así como también resisten periodos ambientales extremos fuera del huésped; a diferencia de los trofozoitos que no logran sobrevivir fuera del ambiente intestinal (Sehgal, Bhattacharya y Bhattacharya, 1996).

Las molestias estomacales que pueden generar la colonización de *E. dispar*, *E. coli*, *E. moshkovskii* y *E. hartmanni* en el intestino del ser humano, en su mayoría no requieren ser tratadas; por el contrario, cualquier infección provocada por *E. histolytica* deberá pasar por un tratamiento farmacológico de metronidazol o paromomicina que ejercerá acción ya sea sobre tejidos blandos o intestino grueso. En casos extremos de infecciones fuera del intestino (cerebro, pulmón e hígado) se requerirá de un tratamiento quirúrgico (Pérez-Arellano et al., 2010).

La prueba diagnóstica para la detección de *Entamoeba spp.* es la microscopía y se basa en la visualización de las diferentes características de morfología y tamaño que presentan los quistes y trofozoitos de cada una de las especies de *Entamoeba*. La microscopía incluye tres metodologías sencillas para identificar dichas estructuras, las cuales constan de un frotis de muestras frescas de heces o de muestras fijadas con reactivos como el tricromo de Wheatley, hematoxilina férrica, iodina-tricromo, entre otros; así como también, de un frotis de muestras concentradas (Pritt y Clark, 2008), es decir el uso de muestras previamente lavadas en sucesivas ocasiones con formol/éter o acetato de etilo para la eliminación de residuos que influyan sobre la visualización microscópica (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001). Pese a ello, las tres metodologías consumen mucho tiempo y son laboriosas.

Uno de los retos principales de la microscopía, es la capacidad técnica que el operador debe mantener para identificar la presencia del parásito sea patógeno o no (Verweij, Laeijendecker, Brienen, Van Lieshout y Polderman, 2003). A pesar de ello, empleando únicamente esta técnica no se lograría diferenciar a las especies, siendo necesaria la implementación de un test de especiación. Se puede considerar que el éxito de la microscopía ocurre cuando, en raras ocasiones, se observan trofozoitos ingiriendo glóbulos rojos dado que *E. histolytica* es el único que fagocita eritrocitos respecto a las otras especies (Pritt y Clark, 2008).

Otra metodología utilizada únicamente para la detección de las especies de *Entamoeba*, mas no como herramienta diagnóstica, son los medios de cultivo axénicos y xénicos utilizados para visualizar el crecimiento del parásito frente a condiciones de flora indefinida (Fotedar et al., 2007). Los cultivos se aplican en laboratorios especializados debido a la dificultad de la técnica y lo laborioso que conlleva aplicarla (Pritt y Clark, 2008). Usualmente los cultivos realizados para el desarrollo de parásitos son costosos y existe una alta probabilidad de encontrar cultivos con un sobrecrecimiento de hongos, bacterias u otras especies de microorganismos no necesarios para un estudio concreto (Fotedar et al., 2007).

Otra técnica utilizada es el análisis de isoenzimas que fue catalogada como el “estándar de oro” para el diagnóstico de amebiasis en la era previa a la molecular. Esta técnica se basa en el movimiento de las zimodemas que son enzimas de amebas y otros microorganismos que comparten exactamente el mismo patrón en la electroforesis, éstas pueden ser: hexoquinasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucoisomerasas y malato deshidrogenasas (Sargeaunt, Williams y Grene, 1978). Se han logrado identificar 24 zimodemas de las cuales 9 corresponden a *E. histolytica* y 12 a *E. dispar*, siendo el ser humano el que posee el mayor número de zimodemas. Una de las desventajas de esta técnica es la dependencia que se tiene hacia los métodos de cultivo, los cuales deben tener un número de células del parásito muy grande, por lo que consume tiempo y además posee baja sensibilidad (Parija, Mandal y Ponnambath, 2014).

Otras técnicas que se han incluido dentro del diagnóstico de amebiasis causada únicamente por infecciones de *E. histolytica* son las biopsias, las técnicas de detección antigénica y las técnicas serológicas. También se han utilizado ensayos moleculares para la detección de *Entamoeba spp* en estudios epidemiológicos.

Con las pruebas serológicas se pretende detectar anticuerpos específicos en la sangre del paciente infectado. Usualmente se aplican estas pruebas para un diagnóstico en países no endémicos, donde infecciones por *E. histolytica* no son comunes, siendo en dichas áreas una técnica con alta sensibilidad (Pritt y Clark, 2008). Del mismo modo, la serología se ha empleado para el diagnóstico de abscesos hepáticos producto de una amebiasis invasiva. La desventaja de esta técnica es la dificultad para diferenciar entre infecciones que ocurrieron en un periodo pasado y en un periodo actual, con la excepción de que se hayan encontrado anticuerpos IgM hacia *E. histolytica*, lo cual sucede rara vez. Asimismo, los anticuerpos IgG se encuentran con frecuencia en áreas endémicas por efecto de la exposición constante del individuo. Para infecciones asintomáticas, el tiempo que se requiere para que los anticuerpos aparezcan en el torrente sanguíneo van de los 7 a los 10 días, por lo que se pueden generar falsos-positivos (Pritt y Clark, 2008).

Las técnicas de detección de antígenos se han aplicado como pruebas confirmatorias de los resultados obtenidos por microscopía. Estas pruebas pueden usar anticuerpos monoclonales o policlonales y así detectar aquellos antígenos de *E. histolytica*. Su sensibilidad, especificidad y rapidez lo convierte en una herramienta cotidiana de diagnóstico de laboratorio. Estas pruebas permiten un mejor análisis de los resultados de las pruebas serológicas en pacientes que viven en lugares endémicos dado que esta prueba permite saber si la infección adquirida por el individuo es pasada o actual (Pritt y Clark, 2008).

Se han desarrollado kits para análisis en sangre, heces, o abscesos hepáticos; proporcionando buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de amebiasis invasiva extra intestinal. Su desventaja suele ser la reactividad cruzada entre los antígenos de las diferentes especies de *Entamoeba spp.* (Pritt y Clark, 2008). Además, estas pruebas no permiten confirmar la presencia de los parásitos no patógenos como *E. coli*, *E. polecki*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii* y *E. dispar*, siendo especies que a pesar de no ser patógenas tienen gran importancia para estudios epidemiológicos en zonas sensibles.

Finalmente, una de las últimas técnicas desarrolladas que presentan una alta sensibilidad y especificidad, son las basadas en ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas nuevas técnicas han servido como base para que medidas como la prevalencia, puedan describir la real distribución y frecuencia del parásito, y así se realicen estudios epidemiológicos adecuados.

Dado que los estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos realizados para la detección de *Entamoeba spp.* han logrado reflejar la patogenicidad de *E. histolytica* frente a las otras especies, la imposibilidad de poder diferenciar de manera morfológica estas especies bajo técnicas de microscopía han llevado a que analíticamente se engloben en un concepto denominado como “Complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii*” (Sard, Navarro y Sanchis, 2011).

Un estudio llevado a cabo por Tanyuksel y Petri (2003) acerca del diagnóstico en laboratorio de amebiasis, demostró la alta sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares como la PCR y técnicas serológicas como ELISA frente a la microscopía para la diferenciación de las especies de *Entamoeba spp.*

Actualmente se conocen varios ensayos basados en PCR para la detección y diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* presentes en muestras de heces (Gutiérrez-Cisneros et al., 2010); Haque et al. (2010); Paul, Srivasta y Bhattacharya (2007); Tanyuksel et al. (2003)). Uno de ellos consiste en la aplicación de una PCR múltiple anidada para la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosomal menor 16S (Khairnar y Parija, 2007).

El desarrollo de cebadores específicos para el género *Entamoeba spp.* se ha convertido en un problema, debido a la gran expansión de diversidad genética de este grupo de protozoos. La amplificación de linajes ribosomales de ADN de muestras fecales se ha logrado con el uso de cebadores *Entam 1* y *Entam 2* (Nozaki y Bhattacharya, 2015), sin embargo, su uso se ha centrado únicamente

en el estudio de la especie patógena y no en un estudio global de la prevalencia de *Entamoeba spp.* en una comunidad específica.

ElBakri, Samie, Ezzedine y Odeh (2013) realizaron un estudio de detección diferencial mediante ELISA y PCR de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en 120 muestras fecales de pacientes asintomáticos. En dicho estudio encontraron que 36 muestras resultaron positivas para el complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* mediante análisis microscópico por la presencia de formas quísticas y vegetativas de las especies analizadas. Por otra parte, con la PCR anidada se encontraron un total de 23 muestras positivas para el complejo *E. histolytica/ E. dispar/E. moshkovskii*, dentro de las cuales 12 estaban infectados únicamente por *E. histolytica*, 3 se encontraban infectadas por *E. dispar*, 3 por *E. moshkovskii*, 4 presentaban infecciones mixtas de *E. histolytica/E.dispar* y 1 muestra por *E. dispar/E. moshkovskii*. Con la prueba de inmunodiagnóstico con ELISA para la detección del antígeno adhesina en las muestras fecales, no se obtuvieron buenos resultados dado que de las 16 muestras PCR positivas para *E. histolytica* incluidas las muestras con infecciones mixtas, ninguna fue detectada por esta técnica, debido a la ausencia del antígeno adhesina de *E. histolytica*. Estos resultados reflejaron la alta sensibilidad y especificidad de la técnica molecular frente a la técnica de microscopía y ELISA.

1.2 Planteamiento del problema

El alcance que han generado los estudios de prevalencia de *Entamoeba spp.* en poblaciones sensibles ha sido muy grande, principalmente porque se ha identificado que la mayor parte de infecciones causadas por *Entamoeba spp.* son atribuidas a la especie patógena *E. histolytica*. A partir de esto, se ha visto un creciente interés por estudiar la prevalencia de este género, sin embargo, el desarrollo de estudios epidemiológicos ha sido complicado debido a que se utiliza mayoritariamente a la microscopía directa como única metodología de diferenciación y diagnóstico de amebiasis intestinal, sobre todo en países con

recursos económicos limitados (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

Una de las técnicas disponibles y estándar de referencia para la detección de las estructuras morfológicas de protozoos en muestras de individuos provenientes de países con recursos económicos limitados, ha sido la microscopía. La limitación de esta técnica para diferenciar las cepas patogénicas de *Entamoeba* con las no patogénicas (Ramana y Kranti, 2012), se debe a la similitud morfológica de los quistes y trofozoitos entre las distintas especies de *Entamoeba*, así como también a la confusión con las estructuras de otras células, como por ejemplo macrófagos o leucocitos (Pérez-Arellano et al., 2010). Este problema refleja una baja sensibilidad de la técnica obteniéndose resultados falsos-positivos en su diagnóstico (Delialioglu et al., 2004), pudiendo llegar a sobre enfatizar a las infecciones amébicas y su forma de distribución (Ali, Clark y Petri, 2008).

El procedimiento técnico coparasitario previo a la observación, se puede realizar en muestras concentradas, frescas o fijadas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los trofozoitos son frágiles al ambiente y no se recomienda ni su refrigeración, ni el contacto al ambiente por periodos largos, dado que se pueden destruir y por ende la observación de las estructuras por microscopía resultaría compleja (Pérez-Arellano et al., 2010).

Las pruebas serológicas se han considerado poco apropiadas en regiones de gran endemismo como Ecuador (Samie, ElBakri, & AbuOdeh, 2012), es decir en áreas geográficas determinadas donde hay mayor presencia de especies endémicas distribuidas en ésta (Parenti y Ebach, 2009). A diferencia de las regiones no endémicas, donde:

“Alrededor del 90% de los individuos que padecen de amebiasis invasiva, ya poseen anticuerpos Anti *Entamoeba histolytica*, reflejando

que específicamente en dichas áreas, la prueba es altamente sensible por el grado de predominancia de pacientes seronegativos” (Reyes y León, 2002).

De esta forma, es necesario el establecimiento de protocolos y la aplicación de herramientas específicas y sensibles que sirvan como medios de diagnóstico rápido de infecciones causadas por amebas. Una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

1.3 Justificación

A pesar de la alta incidencia de enfermedades que provocan las especies patogénicas de *Entamoeba spp*, en el Ecuador, aún no se han realizado estudios nacionales centrados en su detección, específicamente en poblaciones sensibles como las escolares de las regiones Costa, Sierra y Oriente. Por otro lado, se ha descrito un mayor número de especies de *Entamoeba spp*. con las mismas características morfológicas de *E. dispar* y *E. histolytica* lo que ha dificultado aún más su diagnóstico, posibilitando el desconocimiento adecuado de la distribución geográfica de los parásitos y las variables demográficas que influyen en su prevalencia, lo que es importante para el control efectivo de la infección en nuestras poblaciones en riesgo.

El estudio de la prevalencia de infección por protozoarios como *Entamoeba spp*. en el Ecuador descrito en este trabajo, podría considerarse como un trabajo orientativo para la detección rápida de este parásito en el país. Donde si bien las pruebas de PCR son más sensibles, estas aún no han sido empleadas como técnicas de diagnóstico de rutina; debido a su elevado costo y requerimiento de infraestructura. A partir de esta investigación se podría promover el uso combinado de la microscopía con la técnica molecular de PCR, para proporcionar una estrategia clínica valiosa en la detección rápida de parásitos gastrointestinales relevantes (Laude et al., 2018).

El impacto de dichos estudios en el Ecuador será principalmente en el ámbito de la Salud e Investigación médica, dado que se podría promover la aplicación de técnicas moleculares para su uso como herramientas de detección y posible diagnóstico de distintas especies de parásitos de importancia nacional que afectan la calidad de vida de poblaciones sensibles.

Finalmente, con esta investigación se podría sentar un precedente para que estudios de prevalencia de parásitos dentro de una población o comunidad específica se desarrollen, empleando técnicas moleculares en lugar de técnicas convencionales como la microscopía directa; y así minimizar los diagnósticos y tratamientos innecesarios.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia aparente de *Entamoeba spp.* en las regiones Costa, Sierra y Oriente del Ecuador mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.4.2 Objetivos Específicos

Detectar un fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.* en muestras biológicas de escolares del último año de educación básica con edades comprendidas entre los 10 y 14 años mediante PCR punto final.

Comparar la detección de *Entamoeba spp.* utilizando métodos convencionales y de gran uso diagnóstico como la microscopía directa y métodos de última generación diagnóstica como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 Amebas

Las amebas forman parte de un amplio grupo de microorganismos unicelulares que no poseen pared celular, por lo que tienen la ventaja de adquirir diferente morfología. Usualmente el modo de locomoción de las amebas es a través de pseudópodos, los cuales permiten al organismo desplazarse y generar un movimiento ameboideo por efecto de la extensión y contracción de prolongaciones citoplasmáticas.

En su mayoría, las amebas son de vida libre, es decir, viven en cualquier ambiente ya sea terrestre o acuático. Su alimentación es heterótrofa por fagocitosis y dado que no poseen boca, la manera de adquirir su propio alimento es por medio de la ingestión de células, bacterias o plantas microscópicas. Existen algunos géneros de amebas como *Entamoeba spp.* que pueden llegar a ser un parásito para el ser humano causando enfermedades letales como la amebiasis extraintestinal o a su vez no generar daño alguno al organismo.

Las amebas mantienen un ciclo de vida sencillo, caracterizado por dos fases importantes: 1) Fase de trofozoito o fase móvil y 2) Fase quística / de resistencia o infectiva. Las condiciones ambientales adecuadas promueven el movimiento del trofozoito de manera activa dentro del hospedero mientras que, bajo condiciones poco favorables para el crecimiento de los trofozoitos, como la baja humedad y temperatura, se inicia el proceso de desarrollo de quistes (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

2.2 *Entamoeba spp.*

Dentro de este género se encuentran diversas especies de amebas localizadas en el aparato intestinal que parasitan únicamente a los animales vertebrados. A pesar de ello, se han encontrado especies de amebas parásitas que se localizan en el tracto genitourinario o también en la cavidad bucal de ciertos mamíferos. Su forma de interacción biológica generalmente es comensal (relación entre dos organismos donde uno de ellos se beneficia del otro sin que esté presente cierto efecto perjudicial), con la excepción de *Entamoeba histolytica* (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010).

Al igual que los organismos flagelados, *Entamoeba spp.* carece de tres orgánulos importantes: las peroxisomas, la mitocondria y el aparato de Golgi; es por ello que su mecanismo de generación energética es a partir de la glicolisis y fermentación (Fox et al., 2006).

2.3 Clasificación de especies de *Entamoeba spp.*

El género *Entamoeba* está conformado principalmente por 6 tipos de especies que habitan dentro del lumen intestinal de su hospedero, el ser humano. Entre estos se encuentran: *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. histolytica*, *E. polecki*, *E. coli* y *E. dispar* (Fotedar et al., 2007).

2.3.1 *Entamoeba hartmanni*

E. hartmanni es un protozooario intestinal no patógeno que mantiene características morfológicas similares a *E. histolytica*, con la única diferencia de su pequeño tamaño respecto a ésta (Cabello, 2007). Los trofozoitos de *E. hartmanni* miden de 5 µm a 15 µm de diámetro, poseen pseudópodos en forma de dedos y tienen un núcleo con cariosoma central y cromatina periférica

homogénea, el cual es difícil de visualizar sin tinciones previas. El citoplasma es granular con contenido de bacterias (Figura 1).

Los quistes de *E. hartmanni* tienen una morfología redonda/esférica con un tamaño que va desde los 5 μm a los 12 μm de diámetro, en cuyo interior pueden encontrarse de 1 a 4 núcleos. Al igual que *E. histolytica*, los quistes de *E. hartmanni* poseen una capa difusa de glucógeno rodeada por barras cromatoidales que suelen aparecer únicamente en aquellos que son jóvenes (Zeibig, 2013) (Figura 1).

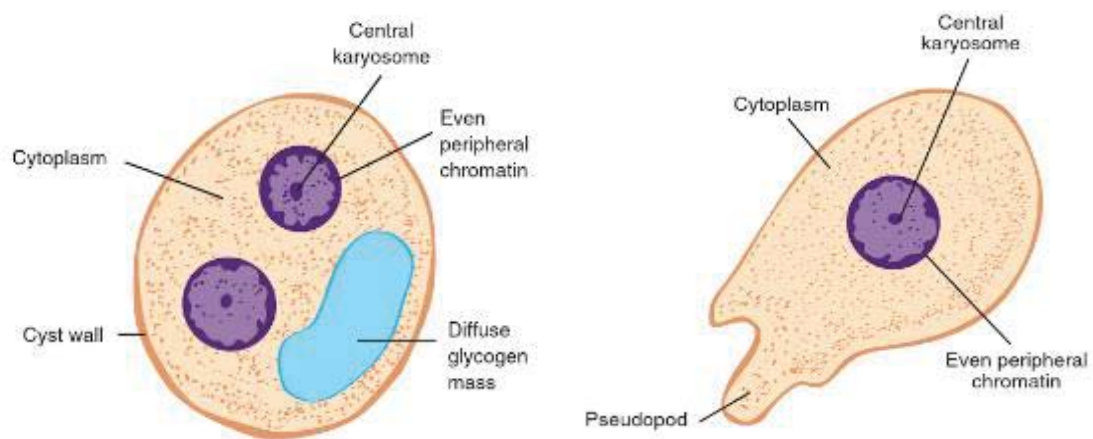


Figura 1. Morfología y partes del quiste y trofozoito de *Entamoeba hartmanni*. Tomado de (Zeibig, 2013)

2.3.2 *Entamoeba coli*

E. coli es un protozoo intestinal no patógeno presente en el intestino grueso del ser humano y en algunos animales. Presenta trofozoitos mononucleares con un tamaño variable desde los 10 μm hasta los 53 μm de diámetro. Los pseudópodos tienen forma “roma” y su movimiento es lento. A diferencia de *E. hartmanni* el núcleo es fácil de reconocer al estar o no teñido y tiene un cariosoma central grande ovalado el cual se encuentra rodeado de cromatina periférica de tamaño variable distribuida a manera de masas desiguales y suele

visualizarse fácilmente al teñirlo (Cabello, 2007). El citoplasma es granular y posee vacuolas con contenido de bacterias (Figura 2).

En cuanto a sus quistes, su tamaño varía entre los 12 μm a los 25 μm de diámetro y tienen forma esférica. El número de núcleos por quiste maduro puede ir de 1 a 8, los cuales pueden ser claramente visualizados. En ciertas ocasiones el citoplasma granular de los quistes jóvenes suele tener pequeñas masas de glucógeno y barras cromatoidales en forma de astilla (Zeibig, 2013) (Figura 2).

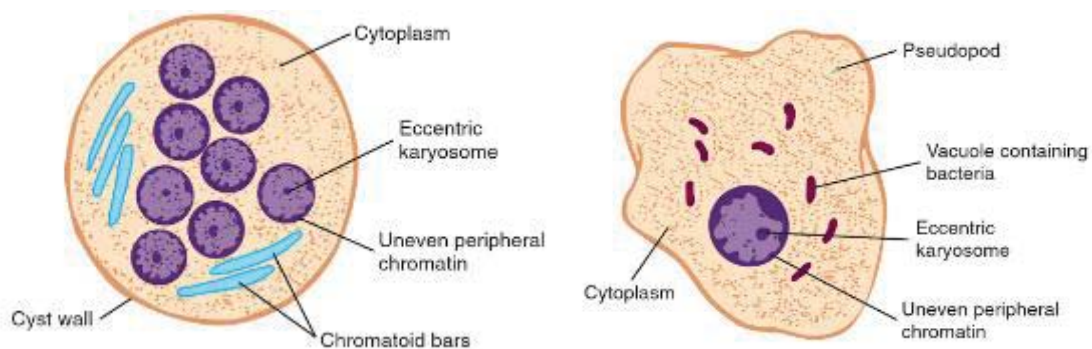


Figura 2. Morfología y partes del quiste y trofozoito de *Entamoeba coli*. Tomado de (Zeibig, 2013)

2.3.3 *Entamoeba polecki*

E. polecki es una ameba intestinal usualmente presente en cerdos, monos, perros, cabras y en el ser humano (raras ocasiones). Su tamaño en fase de trofozoito es similar al tamaño de *E. histolytica* y *E. coli* mientras que en la fase de quiste generalmente es mononuclear. Su distribución es mundial y no es patógeno (Bogitsh, Carter y Oeltmann, 2005).

Los trofozoitos de *E. polecki* poseen un tamaño promedio entre 12 y 20 μm de diámetro. Poseen un citoplasma con presencia de vacuolas y dentro del mismo existe contenido de levaduras o bacterias. Sus pseudópodos tienen forma

granular “roma” con movimiento lento no progresivo observado en muestras de heces normales, mientras que en muestras de heces líquidas los pseudópodos se movilizan de manera progresiva y sin dirección (Figura 3).

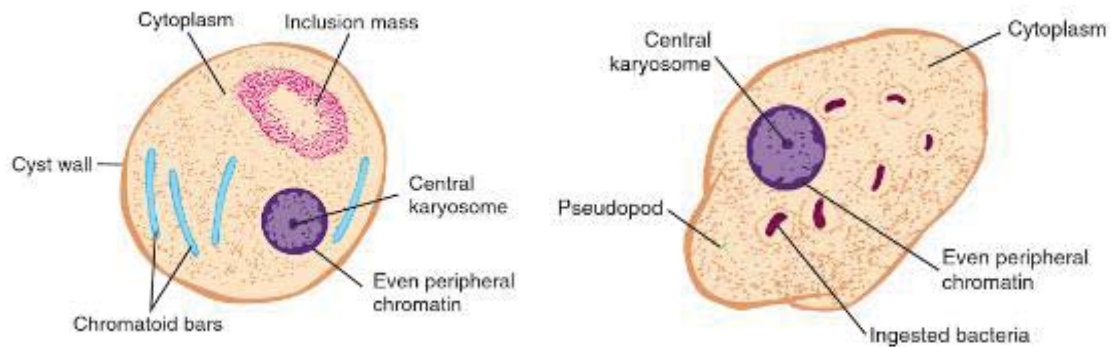


Figura 3. Morfología y partes del quiste y trofozoito de *Entamoeba polecki*. Tomado de (Zeibig, 2013)

El núcleo de *E. polecki* es visible sin tinción y puede presentar formas irregulares. Posee un pequeño cariosoma central, que en ciertas ocasiones al no ser visible tiende a reflejar que el núcleo está vacío debido a que mantiene la cromatina periférica homogénea sobre la membrana nuclear (Ash y Orihel, 2010) (Figura 3).

Los quistes de *E. polecki* tienen un tamaño de entre 12 y 18 μm de diámetro con forma ovalada y a diferencia de *E. coli* y *E. hartmanni*, sus quistes suelen presentar un único núcleo con cariosoma central y cromatina periférica uniforme. En su estado joven, los quistes presentan una pequeña masa de glucógeno en su citoplasma, así como también barras cromatoidales con extremos filios, angulares o también irregulares (Zeibig, 2013) (Figura 3).

2.3.4 *Entamoeba moshkovskii*

E. moshkovskii es una ameba de vida libre cuya fase del ciclo de vida como trofozoito o como quiste son idénticas a las formas de *E. histolytica* y *E. dispar*

en cuanto a tamaño y forma. Esta ameba no es patógena ni se han asociado enfermedades por la misma, sin embargo, se ha observado una alta presencia de *E. moshkovskii* en sedimentos anóxicos, por lo se considera que es altamente osmotolerante (Ali et al., 2003).

2.3.5 *Entamoeba dispar*

En el año 1925 Emile Brumpt, un parasitólogo francés planteo la existencia de dos amebas morfológicamente indistinguibles, pero biológicamente diferentes. Se estableció que la ameba capaz de provocar la patogénesis sobre el ser humano invadiendo los tejidos intestinales y produciendo infecciones, era *E. histolytica*, mientras que la especie sin poder patogénico, pero con mayor prevalencia en las personas, era *E. dispar* (Espinosa Cantellano, Castanon Gutierrez y Martinez-Palomo, 1997). De tal forma que, *E. dispar* es una ameba no patógena cuyas características morfológicas y ciclo de vida son indistinguibles respecto a *E. histolytica*. La gran similitud de especies ha permitido utilizar a *E. dispar* como un modelo para el análisis de factores que puedan influir sobre la patogenicidad de *E. histolytica* (Willhoeft, Hamann y Tannich, 1999).

2.3.6 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es una de las especies de amebas parasitarias del ser humano más conocidas en la actualidad, por ser el principal agente causante de amebiasis intestinal en el ser humano. Se encuentra localizada mayoritariamente en el intestino grueso. Su modo de interacción biológica fue inicialmente descrito como comensal, sin embargo, se ha encontrado que esta especie es capaz de penetrar las barreras del intestino e invadir la mucosa de sus paredes, provocando daño sobre la mucosa del intestino y a su vez ocasionando úlceras, razón por la cual se la ha denominado como especie patógena (Kotpal, 2012).

Su citoplasma es granular y una de sus características más importantes respecto a las otras especies de *Entamoeba spp.*, es la presencia de eritrocitos (RBCs, siglas en inglés). La visualización de trofozoitos con glóbulos rojos fagocitados, refleja que hay una invasión de las paredes del intestino del hospedero y por ende se confirma el padecimiento de una amebiasis invasiva (Fleta Zaragoza, Bueno Lozano y Bueno Lozano, 2000). Esta diferencia ha sido la única utilizada para el diagnóstico diferencial de las especies de amebas intestinales patógenas como *E. histolytica* y no patógenas como *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii* y *E. polecki* (Zeibig, 2013).

En cuanto a sus trofozoitos, su tamaño oscila entre los 10 y 60 μm de diámetro, siendo la forma más grande la que invade los tejidos de la mucosa intestinal mientras que las pequeñas corresponden a las formas no invasivas. Su movimiento rápido, progresivo y de una sola dirección se lleva a cabo por efecto de pseudópodos que tienen forma de dedos. Los trofozoitos son mononucleares y visibles bajo tinción; poseen un cariosoma central rodeado por material de cromatina, el cual forma una estructura denominada cromatina periférica que se mantiene distribuida uniformemente alrededor del núcleo (Zeibig, 2013) (Figura 4).

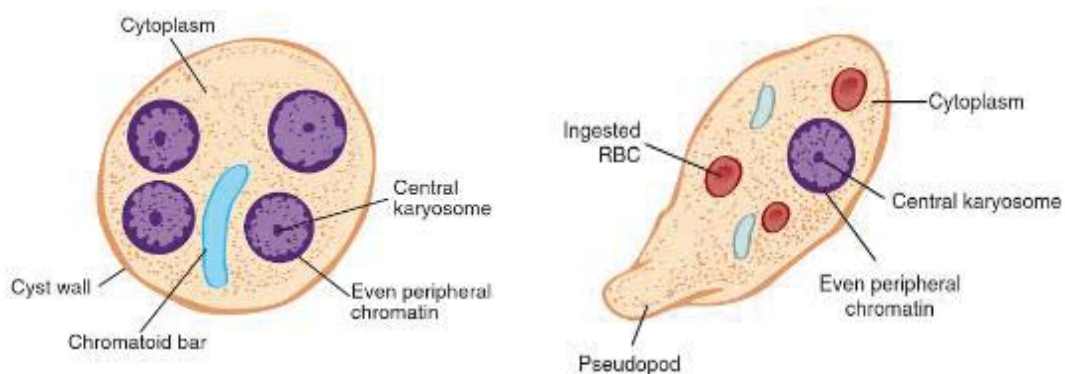


Figura 4. Morfología y partes del quiste y trofozoito de *Entamoeba histolytica*. Tomado de (Zeibig, 2013)

Los quistes de *E. histolytica* oscilan entre los 8 μm y 22 μm de diámetro y tienen forma esférica. Cuando los quistes son jóvenes presentan barras cromatoidales cuadradas o circulares que desaparecen cuando éste madura, así como también masas de glucógeno que representan alimento almacenado. El número de núcleos por quiste puede variar de 1 a 4 según la fase de maduración, por lo que un quiste cuadrinucleado se presenta únicamente cuando el quiste ha llegado a la fase infectiva y se encuentra maduro. El citoplasma suele ser granular con presencia de leucocitos (Zeibig, 2013) (Figura 4).

2.4 Hospedero

E. dispar, *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli* y *E. moshkovskii* tienen carácter monogénico, es decir, que no requieren de ningún intermediario para culminar con su ciclo de vida, por lo que solamente necesitan de un hospedero, el ser humano (Kotpal, 2012). A excepción de la especie *E. polecki* que parasita monos, cerdos, gatos entre otros animales; la infección en humanos prevalece únicamente en poblaciones que se encuentran en contacto directo con animales (Brooke, Melvin y Healy, 1983).

2.5 Reproducción

El modo de reproducción de las especies de *Entamoeba spp.* es asexual a través de fisión binaria, la cual ocurre dentro de las paredes del intestino grueso del ser humano. Durante este proceso se produce una mitosis del núcleo, sin que se refleje una pérdida de la membrana nuclear y durante ésta, ocurre la citocinesis, es decir la división del citoplasma, que dará lugar a dos organismos que crecerán en tamaño y dependiendo de las condiciones del hospedero, se alimentarán de tejidos del huésped (en algunos casos células frescas) y bacterias hasta volver a reproducirse por fisión binaria o mantenerse como pre- quistes (Kotpal, 2012).

2.6 Transmisión (Vector)

Los principales reservorios de las seis especies de *Entamoeba spp.* son el agua, alimentos contaminados con quistes maduros y seres humanos sintomáticos o asintomáticos que presentan el endoparásito. La transmisión ocurre por ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes, por insectos que transporten los quistes hacia alimentos de consumo humano o por contacto fecal-oral al no mantener una adecuada higiene (Engelkirk, Duben-Engelki y Burton, 2011).

2.7 Ciclo de Vida

Las formas quísticas o vegetativas de *E. histolytica* se mantienen en las heces. Normalmente los trofozoitos se pueden encontrar en muestras líquidas de pacientes, mientras que los quistes tienden a aparecer en las muestras sólidas uniformes.

El primer proceso dentro del ciclo de vida de *Entamoeba spp.*, es la ingestión de quistes maduros por parte del hospedero, los cuales pueden estar presentes tanto en manos no lavadas como alimentos o agua contaminados con heces. Una vez ingeridos los quistes, éstos llegan al estómago sin sufrir daño alguno por el jugo gástrico dado que son resistentes y luego pasan al intestino delgado.

Cada quiste puede generar ocho trofozoitos en el intestino delgado, dándose así un proceso denominado como exquistación, donde se liberan los trofozoitos del intestino delgado y migran hacia el intestino grueso. Una vez establecidos en el medio intestinal, los trofozoitos se reproducen por fisión binaria y generan un número específico de quistes dependiendo de la especie.

Las barreras protectoras de los quistes aseguran que éstos puedan permanecer en un medio externo diferente al intestinal por días o semanas, siendo los quistes los encargados de la transmisión principal; y a pesar de ello, los trofozoitos son más vulnerables a sobrevivir ante cambios ambientales, por lo que una vez que salen del cuerpo son destruidos. Si se da el caso en que logran salir y ser ingeridos, inmediatamente mueren por efecto de los ácidos gástricos del estómago.

Cuando los trofozoitos poseen un ambiente propicio para su crecimiento, se mantienen en el lumen intestinal del ser humano, donde se multiplicarán por fisión binaria y formarán nuevos quistes. Estos quistes se liberarán del organismo por medio de las heces y así se desarrollarán las infecciones intestinales no invasivas que no causarán sintomatología sobre el individuo, mientras que los trofozoitos que invaden la mucosa intestinal y colonizan en las células epiteliales del colon, provocan una lisis de las células y por consiguiente se desarrollan úlceras. Hay ocasiones en las cuales los trofozoitos pueden llegar al torrente sanguíneo u órganos externos al digestivo como pulmones, hígado o cerebro, ocasionando enfermedades extraintestinales severas con manifestación patológica intensa.

(Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2016)

2.8 Factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*

La patogenicidad asociada a las infecciones provocadas por *E. histolytica* depende de factores de virulencia que ayudan al parásito a resistir los mecanismos de defensa del huésped, a evadirlos y a asegurar su invasión hacia los tejidos intestinales, induciendo inflamaciones (Burleigh y Soldati, 2008).

E. histolytica posee 3 factores de virulencia:

1) Lectina Gal/GalNac

La lectina Gal/GalNac pertenece al grupo de factores de virulencia más importantes de *E. histolytica* debido a que participan en la resistencia del parásito al sistema de complemento del huésped permitiendo la invasión, adherencia y lisis celular. Uno de los procesos principales en la patogénesis de amebiasis intestinal es la adherencia a las paredes de la mucosa del intestino. Los trofozoitos del parásito se adhieren a la pared intestinal, al epitelio del colon, a eritrocitos, a ciertas bacterias circundantes, a glicoproteínas del colon o hasta a neutrófilos a través de la lectina Gal/GalNac. Esta proteína multifuncional está compuesta por heterodímeros pesados y ligeros de 170-kDa y 35/31k-Da, que se unen a los residuos terminales expuestos de la Gal/Gal/Nac de las glicoproteínas de las células diana. Del mismo modo, la adhesina de 112KDa y la lectina de 220kDa están envueltas en procesos de adhesión (Burleigh y Soldati, 2008).

2) Amebaporos

Cuando *E. histolytica* ha logrado colonizar y establecerse dentro del cuerpo del huésped manteniendo contacto directo con sus células, se desarrollan diversos eventos citolíticos que ocasionan una “hinchazón” en la célula hasta el punto de provocar una lisis, permitiendo que el parásito se esponga completamente. Esto tiene una gran similitud con el proceso de lisis mediada por proteínas perforinas de células diana en los linfocitos citotóxicos, dado que ellas forman estructuras cilíndricas que sobrepasan la bicapa lipídica y forman canales donde se da el paso de iones o distintos componentes que inducen una ruptura de la célula diana. Por ello se ha planteado la existencia de posibles proteínas formadoras de poros denominadas amebaporos, las cuales se encuentran

contenidas dentro de las vesículas citoplasmáticas de los trofozoitos de *E. histolytica* (Burleigh y Soldati, 2008).

3) Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína forman parte de un grupo de enzimas proteolíticas (degradan proteínas) secretadas por la *E. histolytica* dentro del ambiente intestinal. Estas enzimas actúan evadiendo la respuesta inmune provocada por el organismo cuando es atacado por un microorganismo patógeno, mediante su habilidad para degradar los componentes de la respuesta inmune como las inmunoglobulinas IgG e IgA, así como también degradan la proteína precursora de la citosina IL-18 mediadora de la respuesta inmune y la proteína necesaria para ejercer procesos de inflamación (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009).

2.9 Patogénesis

La patogénesis asociada a las infecciones provocadas por *E. histolytica* suele variar de una enfermedad invasiva a una no invasiva dependiendo del hospedero y su sistema inmunitario. Las infecciones intestinales no invasivas, pueden provocar dolor estomacal o diarrea; pero las infecciones intestinales invasivas tienden a convertirse en progresivas y generar efectos letales sobre el hospedero. Asimismo, las amebas pueden llegar a colonizar otros órganos y provocar enfermedades extraintestinales (Wiser, 2010).

Las especies *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii* y *E. dispar* no causan enfermedad alguna, por lo que no requieren tratamiento farmacológico; sin embargo, cuando los pacientes se ven infectados con estos parásitos benignos, se puede asumir que habrá una infección en el organismo por la introducción de otros microorganismo patógenos presentes en el agua o alimento contaminado que el huésped ingirió, y de esta forma estos patógenos provocarán alguna sintomatología de infección intestinal (Issa, 2014). La

patogénesis de *E. polecki* en seres humanos es poco frecuente, pero suele ser asintomática con presencia de diarrea, fiebre, náuseas y dolores abdominales en caso de una gran invasión (Issa, 2014).

2.10 Causas de la Amebiasis

Las seis especies de *Entamoeba* que habitan en el ser humano, se distribuyen mundialmente y están estrechamente ligadas a tres factores:

1) Malos hábitos de higiene

La distribución de las especies de *Entamoeba* es cosmopolita, pero, así como otros protozoos intestinales, éstos se han encontrado mayoritariamente en países y zonas cuyas condiciones sanitarias son escasas (Vinuesa Osorio, 2015). Las infecciones se generan por la presencia de quistes infecciosos provenientes de las heces del hospedero, en frutas o vegetales mal lavados o aguas de consumo humano.

2) Condición socioeconómica

La calidad de vida de una población depende en gran parte de los recursos económicos que ésta posee. Se ha determinado que padres de familia con bajo nivel de educación tienen menor conocimiento de cómo controlar las infecciones parasitarias que son totalmente inevitables en los niños. Por lo tanto, menores de edad expuestos a este tipo de hábitos familiares y ambientales promueven que la educación sanitaria sea cada vez más deficiente y de esta manera, sean éstas las poblaciones con mayor susceptibilidad a padecer cualquier tipo de infección (Choi y Kim, 2017).

3) Población vulnerable

El Ecuador se encuentra dentro del grupo de países con gran endemismo de *Entamoeba*, por lo que el grado de sintomatología de las infecciones es bajo o nulo en estas poblaciones. Generalmente este grupo suele representarse dentro de la epidemiología, como una de las categorías más olvidadas dado que se suele tratar únicamente a los pacientes con sintomatología (Gatti et al., 2002).

4) Determinantes genéticos del huésped

Se ha encontrado que la presencia de polimorfismos de un solo aminoácido en el receptor de la leptina presente en niños con malnutrición se asocia con la infección y posible susceptibilidad a *E. histolytica*. Esto demuestra que la susceptibilidad a padecer infecciones por este parásito se debe a la presencia de variantes genéticas en la leptina y su receptor que alteran la vía de señalización de esta hormona, influyendo sobre el estado nutricional e inmunológico del huésped (Ralston y Petri, 2011).

2.11 Epidemiología

Alrededor del mundo existen un total de 450 millones de personas infectadas al año por *E. histolytica*. Esto refleja que aproximadamente 100 mil individuos mueran anualmente a causa de infecciones intestinales provocadas por este parásito. La amebiasis intestinal corresponde a la tercera causa de muerte después de la malaria; sin embargo, alrededor del 90% de las personas infectadas por el parásito tienden a ser portadores asintomáticos (Yimer, Zenebe, Mulu, Abera y Saugar, 2017).

La epidemiología de amebiasis intestinal ha sido compleja de establecer, dado que únicamente se ha obtenido información en base a metodologías clásicas

como la microscopía, por lo que a pesar de que la mayoría de muertes son producidas por infecciones de *E. histolytica*, la real prevalencia se consideraría sobreestimada dado que es morfológicamente imposible diferenciar entre *E. dispar* y *E. moshkovskii* (especies no patógenas) (Ali et al., 2008).

2.12 Métodos de diagnóstico

Las metodologías aún empleadas en países en desarrollo consisten en el hallazgo de las formas quísticas o vegetativas del parásito en las heces ya sean líquidas o uniformes. También se han desarrollado un sinnúmero de pruebas (serología, identificación antigénica ELISA, estudios isoenzimáticos y cultivos, etc) que han logrado confirmar los resultados proporcionados por la microscopía, técnica utilizada como el estándar de referencia; pero éstas solo sirven para la identificación de la especie patógena *E. histolytica* mas no para la identificación del género *Entamoeba*.

No obstante, el desarrollo de la biología molecular ha permitido la aplicación de nuevas técnicas para la diferenciación de las especies de *Entamoeba spp.*, sirviendo ésta como una posible herramienta de detección de sus diferentes especies. Esto puede servir no sólo para el tratamiento de aquellos pacientes que poseen la enfermedad, sino también para el alto porcentaje de individuos infectados que no poseen sintomatología.

2.13 Mecanismo de defensa del hospedero

Un microorganismo con acción patogénica sobre el ser humano y animales siempre expresará un sinnúmero de moléculas encargadas de promover una patología específica. Estas moléculas cumplen distintas funciones ya sea participando en procesos de adhesión del parásito a tejidos del organismo, colonización, establecimiento del microorganismo en el cuerpo, invasión de

tejidos e inhibición de mecanismos de respuesta inmune que genera el huésped infectado (Faust y Guillen, 2012).

Estas moléculas se denominan factores de virulencia y no solamente influyen sobre las funciones del hospedero para poder entrar y diseminarse dentro del cuerpo, sino que también se consideran como mecanismos del parásito que les permite la supervivencia y adaptación dentro de un ambiente variable como el cuerpo humano (Faust y Guillen, 2012).

E. histolytica mantiene una alta virulencia debido a la expresión de factores de virulencia específicos y a su capacidad de adherirse a tejidos y provocar daños que alteran el equilibrio del cuerpo, ocasionando una proteólisis de la matriz extracelular (Faust y Guillen, 2012). Esta matriz es una red tridimensional necesaria para proveer nutrición a la célula, protección biofísica e inervación de distintas células con otras. Su posible alteración provocaría pérdida de sustratos para una adecuada respuesta inmunitaria frente a agentes externos (Naranjo, Noguera-Salvá y Guerrero, 2009).

Es así como *E. histolytica* utiliza estas estrategias para evadir los mecanismos de defensa inmunitaria innata y adaptativa del ser humano y ocasionar daños sobre el intestino e hígado.

Dentro de la cadena de defensa inmunitaria del hospedero contra *E. histolytica* participa:

1) Inmunidad Innata

Una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos es el ácido gástrico del estómago dado que existen distintos microorganismos que no logran sobrepasar estas barreras y tienden a morir por su sensibilidad a la

acidez. A pesar de ello, se ha encontrado que los quistes de *E. histolytica* son resistentes al ambiente del estómago a diferencia de sus trofozoitos. La segunda línea de defensa corresponde a la mucosa intestinal ya que provee una barrera de protección al epitelio del intestino evitando que *E. histolytica* logre invadir las células del mismo (Moonah, Jiang y Petri, 2013).

Otro componente importante en la defensa innata es la mucina, una glicoproteína secretada por las glándulas de la submucosa intestinal y sus células. Esta glicoproteína tiene la función de inhibir a la lectina de adherencia Gal/GalNac del parásito y así evitar que éstas logren adherirse y provoquen una muerte celular (Moonah et al., 2013).

Cuando las células epiteliales del intestino entran en contacto con los trofozoitos de *E. histolytica*, inmediatamente se desencadena una liberación de moléculas proteicas como las quimiocinas (Moonah et al., 2013), en especial la interleucina 8 (IL-8) o también llamada citosina proinflamatoria que actúa promoviendo el movimiento de los glóbulos rojos hacia los sitios de inflamación y asegurando un reclutamiento de células inmunes (Asencio, 2006). Durante la inflamación, las interleucinas IL8 atraen a los neutrófilos activándolos (Brennan y Zheng, 2007). Por ello, éstos son una de las primeras células inmunitarias en responder ante el ataque de amebas como *E. histolytica*. En estudios *in vitro* se ha observado que los neutrófilos poseen una actividad amébrica dado que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés), que provocan una destrucción del tejido infectado y una posible eliminación del parásito. (Moonah et al., 2013).

De igual manera existen otras células del sistema inmune que generan respuestas frente a la amebiasis intestinal de *E. histolytica* y son los macrófagos, considerados como los principales sensores de peligro del hospedero (Mosser y Edwards, 2009). Los macrófagos poseen receptores tipo toll que se expresan en las células presentadoras de antígenos y actúan como

identificadores de distintas estructuras de moléculas que están asociadas a patógenos y que no se encuentran presentes en las células del hospedero (Villanueva y Patiño, 2006).

2) Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa corresponde a uno de los más importantes mecanismos de defensa del ser humano al igual que la inmunidad innata. Esta línea de defensa proporciona una respuesta específica hacia un agente patógeno, el cual es reconocido y posteriormente eliminado del cuerpo. Asimismo, se encuentra el interferón gamma (IFN- γ) que activa los neutrófilos y macrófagos para eliminar al parásito (Moonah et al., 2013).

2.14 Tratamiento

Para el tratamiento de amebiasis intestinal causada por la ameba patógena y dependiendo de la condición del paciente si presenta una infección invasiva o no invasiva, se recomienda el uso de fármacos con acción luminal (efecto sobre el intestino) o con acción en tejidos (Tabla 1).

Cuando el paciente no presenta síntomas, se considera una amebiasis no invasiva por lo que uno de los fármacos con acción luminal recetado es el iodoquinol. La paromomicina o la diloxanida no son eficaces para pacientes que se encuentran en etapas de amebiasis severas donde se ha expandido la infección hacia tejidos y órganos distantes, dado que no es posible su completa absorción. En dichos casos, se requerirán de amebicidas de tejido, los cuales no eliminarán de manera completa la ameba del lumen intestinal, por lo que deberán pasar por un segundo tratamiento con un agente luminal que permita eliminar completamente la infección. Una vez que la amebiasis ha llevado a la perforación de las paredes intestinales, se recomienda el uso de antibióticos de alto espectro para tratar las bacterias intestinales (Tabla 1).

Tabla 1.

Fármacos utilizados para el tratamiento de amebiasis

Fármacos	Uso
Iodoquinol, paromomicina o diloxanida furoato	Agentes lumbinales para el tratamiento de casos asintomáticos de amebiasis y como tratamiento de seguimiento después del uso de tinidazol.
Metronidazol o tinidazol	Tratamiento para colitis no disentérica, disentérica e infecciones extraintestinales.
Emetina o dehidroemetina	Tratamiento de enfermedades severas como la colitis necrótica o perforación de la pared intestinal.

Tomado de (Wiser, 2010)

Una de las reglas estándar aplicadas para los individuos que viven en zonas endémicas del parásito, donde el tratamiento es costoso y existe una alta tasa de reinfección, es tratar únicamente los casos que presentan síntomas, mediante antiparasitarios como el Metronidazol o tinidazol. Pero a pesar de que estos fármacos son absorbidos por el organismo y poseen una adecuada tolerancia y bajos efectos secundarios, no se llega a una concentración adecuada para que éste ejerza un efecto directo dentro del lumen intestinal (Wiser, 2010).

2.15 Medidas de prevención y control

Una de las principales alternativas para prevenir infecciones intestinales causadas por las distintas especies de *Entamoeba spp*, es la mejora en la educación sanitaria en países cuya prevalencia y endemismo del parásito es

alta. A través de la educación se mejorarán las condiciones de vida de las personas.

Existen metodologías establecidas para lograr dicha mejoría, a continuación, se nombran algunas.

- Educación sanitaria

A través de la educación sanitaria, se podrá comprender la alta resistencia de los quistes de *E. histolytica* a agentes químicos como el cloro, a presiones osmóticas y a ambientes que varían en pH; y así conocer las formas de contrarrestarlo en: ambientes secos, calientes o helados (Davis y Pawlowski, 1985)

- Saneamiento ambiental: Abastecimiento de agua e inocuidad alimentaria

La forma de contagio que más se presenta es la transmisión fecal-oral por medio de las manos o alimento, por lo que una adecuada higiene personal es una de las prioridades dentro de las medidas preventivas. La importancia de una adecuada disponibilidad y calidad de agua para las personas es otra medida preventiva de cualquier tipo de infección (Davis y Pawlowski, 1985).

- Detección temprana y tratamiento de infecciones

Un componente crítico para el control de las infecciones es la aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico temprano que sean sensibles y específicas. El empleo de éstas permitirá llevar a cabo un adecuado proceso de tratamiento a los pacientes que han sido diagnosticados con amebiasis causada por *E. histolytica* (Zibaei, Firoozeh y Azargoon, 2012).

3. Capítulo III. Metodología

El programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD) desarrollado durante 4 años por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) se creó para determinar la prevalencia de las parasitosis desatendidas y reemergentes en el Ecuador continental, en especial las enteroparasitosis producidas por protozoarios y helmintos. El programa cuenta con 5 proyectos encargados de realizar diferentes estudios. La presente investigación se desarrolló en el Proyecto 3, responsable de estandarizar e implementar pruebas moleculares para el diagnóstico y profilaxis temprana de las parasitosis desatendidas en el Ecuador. Los datos de microscopía directa (coproparasitario simple) fueron tomados del Proyecto 4, encargado de determinar la prevalencia de las parasitosis desatendidas en el Ecuador en especial los protozoarios y helmintos, mediante técnicas diagnósticas por microscopía directa.

3.1 Determinación de la población y muestra

Para la investigación se seleccionó una población de niños y niñas de 10 a 14 años pertenecientes al 7mo año de educación básica de escuelas fiscales de todo el territorio continental ecuatoriano debido a que Ecuador es considerado como un país de alta prevalencia en enteroparasitosis y helmintosis por la OPS (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, s.f.).

Como parte del protocolo desarrollado por el programa se determinó que, durante la recolección de las muestras, cada padre o representante legal de los niños incluidos en el estudio sea informado acerca de las características del estudio, el tipo de muestras biológicas solicitada (heces) y los beneficios que supone el participar dentro del proyecto. Cada padre o representante legal firmó un consentimiento informado, el cual fue entregado antes de la realización del procedimiento, contándose además con el consentimiento in situ de los niños participantes durante la colecta de las muestras coprológicas.

Para la realización del estudio, se utilizó material biológico (heces) colectado por el programa PROPAD del INSPI, el cual se conservó en soluciones de etanol al 70%. Se tomaron de manera aleatoria 508 muestras distribuidas de la siguiente manera: 149 muestras en la región Costa, 210 en la Sierra y 149 en el Oriente.

3.2 Identificación de puntos estratégicos

Se determinaron las zonas de estudio en base a tres aspectos del territorio ecuatoriano: cartográficos, ambientales y demográficos. Para ello se consideró la altimetría, la biomasa de los ríos, y la biomasa terrestre, dado que son factores cuyas características ambientales son propicias para el posible desarrollo de parásitos. Con estos datos, la recolección de las muestras se realizó en 18 provincias distribuidas en las tres regiones Costa, Sierra y Oriente (Ver Tabla 2).

Tabla 2.

Provincias y regiones del diseño muestral

Número	Provincia	Región
1	Azuay	Sierra
2	Cañar	Sierra
3	Chimborazo	Sierra
4	Cotopaxi	Sierra
5	El Oro	Costa
6	Esmeraldas	Costa
7	Guayas	Costa
8	Imbabura	Sierra
9	Loja	Sierra
10	Los Ríos	Costa
11	Manabí	Costa
12	Morona Santiago	Oriente
13	Orellana	Oriente
14	Pichincha	Sierra
15	Santa Elena	Costa
16	Santo Domingo de los Tsáchilas	Costa

17	Tungurahua	Sierra
18	Zamora Chinchipe	Oriente

La n muestral se determinó por conglomerados tomando en cuenta el número total de parroquias y escuelas en las provincias seleccionadas, así como el número total de alumnos del 7mo año de educación básica de las escuelas fiscales del Ecuador continental.

3.3 Aspectos Bioéticos y Sociales

El programa PROPAD para el desarrollo de sus investigaciones entregó la metodología a realizar, al Comité de Bioética de la Universidad Central del Ecuador para su análisis, valoración y aprobación del aval específico; documento que fue conocido por el Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de las Américas (CEBE-UDLA) junto con el permiso de ejecución del proyecto 3 (Estandarización e implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico y profilaxis temprana de las parasitosis desatendidas en el Ecuador) de PROPAD emitido por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (ANEXO 4 y 5).

Durante la recolección de las muestras, cada representante legal de los participantes del estudio (niños menores de 15 años) fue informado acerca de las características del estudio, el tipo de muestras biológicas solicitada (heces) y los beneficios que supone el participar dentro del proyecto. Cada representante legal firmó un consentimiento informado, el cual fue entregado antes de la realización del procedimiento.

3.4 Etapa de biología molecular

3.4.1 Lavados de muestras de heces

Las muestras de heces almacenadas a -80°C fueron centrifugadas durante 5 minutos a 14.000 rpm. Se retiraron los tubos de la centrifuga y se extrajo el sobrenadante formado en cada tubo con una micropipeta, manteniendo intacto el precipitado de heces formado en la parte inferior. Luego, con un hisopo o palillo se tomó parte del precipitado por tubo hasta completar 50 mg de heces y se colocó cada uno en un nuevo tubo de 1,5 mL para microcentrifuga debidamente etiquetado con su respectivo código.

Luego se tomaron 700 μL de PBS 1X y se añadieron a los tubos previamente etiquetados, los cuales fueron agitados con la ayuda de un vórtex durante 15 segundos. Una vez agitados se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 rpm retirando el sobrenadante y manteniendo el precipitado. Este proceso se llevó a cabo durante 3 veces consecutivas. Finalizado el tercer lavado, se colocaron 250 μL de PBS 1X en cada tubo y se almacenaron a -80°C para ser utilizados en la extracción.

3.4.2 Extracción de ADN de muestras de heces

La extracción del ADN total de heces se realizó mediante el protocolo estandarizado P.20150311.Ext. Heces.009, utilizando un juego de reactivos de MagaZorb® DNA Mini- Prep Kit (Promega, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agitó cada reactivo previo a su uso ya sea de forma manual o mediante vórtex, procurando evitar la generación de burbujas.

Se tomaron las muestras de heces previamente lavadas y se agitaron por vórtex durante 10 segundos hasta observar homogeneidad en las mismas. Luego se tomó la proteinasa K y se transfirieron 20 μL a cada uno de los tubos

y se procedió a agitar la mezcla obtenida. Inmediatamente se añadieron 200 μL de buffer lisis evitando la generación de burbujas. Finalmente, se homogenizaron las muestras por vórtex y se incubaron a -56°C en baño maría por un periodo de 2 horas y media.

Luego de la incubación, se retiraron las muestras del baño maría y se volvieron a mezclar por vórtex durante 10 segundos, para obtener una distribución homogénea de partículas; después se añadieron 500 μL de Binding Buffer en los tubos de 1,5 mL para microcentrifuga y se agitaron por 15 segundos. A continuación, se agregaron 20 μL de Magazorb® Reagent a cada tubo y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se colocaron los tubos en los pocillos de un rack magnético por 3 minutos hasta observar que los imanes del reactivo hayan quedado adheridos a la pared del tubo y la muestra esté expuesta para ser lavada.

Con una micropipeta se extrajo el líquido remanente de cada tubo evitando el contacto con los imanes y se desechó, una vez retirado el líquido se procedió a añadir 700 μL de Wash Buffer en cada tubo y se mezcló hasta lograr que los imanes se encuentren dispersos con el buffer. Una vez homogenizado, se colocaron los tubos nuevamente en los racks magnéticos por 3 minutos hasta que las partículas se adhieran a la pared del tubo. Posterior a ello, con una micropipeta se retiró nuevamente el líquido sobrenadante, sin los imanes. Este proceso se llevó cabo el número de veces necesario hasta que no quede ninguna partícula dispersa.

Una vez finalizados los lavados, se desechó el último sobrenadante de cada tubo y se colocaron a su vez 100 μL de buffer de elución. En este paso se mezclaron por vórtex hasta que las partículas estén en contacto con el buffer, obteniéndose una solución oscura. Se llevaron las muestras mezcladas a baño maría por 10 minutos, luego se colocaron las muestras sobre los pocillos de los racks magnéticos y se dejaron reposar por 3 minutos más. Pasado este tiempo,

con una micropipeta se tomaron los 100 μ L de sobrenadante sin entrar en contacto con imanes. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos para microcentrífuga de 1,5 mL y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso en la PCR punto final.

3.4.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta con el equipo NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para ello se cargó 1 μ L de ADN en el pedestal y se cuantificó el material genético por triplicado.

3.4.4 Amplificación de fragmentos de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.* con cebadores de género

El ADN extraído de las muestras de heces fue utilizado para realizar la amplificación de fragmentos del gen que codifica para una secuencia de la subunidad ribosomal menor común en las muestras de *Entamoeba spp.* mediante PCR de punto final.

Dependiendo de la especie el par de cebadores utilizados amplificaron fragmentos de 590 y 630 pares de bases. El tamaño de banda esperado para el complejo *E. histolytica/E. dispar/E.moshkovskii* es de 590 pb y para *Entamoeba coli* es de 630 pb. El diseño de los cebadores empleados fue descrito y llevado a cabo en un estudio realizado por (Verweij, Polderman y Clark, 2001) (Tabla 3).

Tabla 3.

Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación del fragmento de la subunidad ribosomal menor de Entamoeba spp.

Nombre del cebador	Sentido del cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Región
Entam 1	Cebador (Forward)	5'- GTT GAT CCT GCC AGT ATT ATA TG -3'	(590- 630)	SSU rRNA
Entam 2	Cebador (Reverse)	5'- CAC TAT TGG AGC TGG AAT TAC - 3'	(590- 630)	SSU rRNA

Tomado de (Verweij, Polderman y Clark, 2001)

Los volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para la PCR fueron estandarizados por el Proyecto 3 del Programa PROPAD en el protocolo P.20150821.Amp. Enta.004 y cuyo detalle se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 4.

Volúmenes y concentraciones de los componentes de la mezcla estándar de la PCR punto final.

Reactivos	Stock	Concentración Inicial	Volumen 1 reacción
PCR Buffer	5 X	1 X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5 µL	1,5 µL
dNTPs	10 mM	200 µM	0,5 µL
Go Taq Flexi DNA polimerasa	5U/µL	1,5 U	0,3 µL
F	10 µM	0,8 µM	2 µL
R	10 µM	0,8 µM	2 µL
Agua libre de nucleasas	-	-	8,7 µL
ADN	-	-	5 µL
Volumen final: 25 µL			

Cada una de las tandas de muestras analizadas llevó un control negativo que consistió en agua libre de nucleasas en reemplazo del ADN del parásito.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se llevó a cabo la PCR en un equipo termociclador (Mastercycler® gradient de Eppendorf) con las siguientes condiciones para la amplificación: 94°C por 3 minutos para la denaturación inicial, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una elongación final a 72°C por 5 minutos.

3.5 Análisis de la amplificación

Para comprobar la amplificación del fragmento de 590 o 630 pb se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando *Syber Safe* (Invitrogen, EEUU) como agente intercalante. Se montó el gel en la cámara de electroforesis horizontal y se cargó 1,5 µL de TrackIt™ 100 bp DNA ladder (Invitrogen, EEUU) en un pocillo y 5 µL del producto de PCR en los demás pocillos. La electroforesis se corrió a 120 V por 35 minutos. Los resultados se visualizaron en el Fotodocumentador Gel Doc (BIORAD, EEUU).

3.6 Selección de las muestras positivas de *Entamoeba spp.*

Una vez concluido con el paneo total de las 508 muestras distribuidas en la región Costa, Sierra y Oriente del Ecuador, se seleccionaron aquellas que mostraron una banda de 530 o 630 pb.

3.7 Análisis estadístico

3.7.1 Prevalencia aparente y real

Para la obtención de la prevalencia aparente y real se utilizaron las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$P = \frac{\text{Total de casos en una población}}{\text{Total de la población}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Se tomó en cuenta el número total de muestras detectadas como positivas mediante PCR para *Entamoeba spp.* y se dividió para el número total de la población (508). De igual forma se calculó la prevalencia aparente por región.

La prevalencia real fue estimada a partir de la ecuación de *Rogan- Gladen* utilizando los datos de prevalencia aparente, sensibilidad y especificidad de la prueba.

$$\text{Prevalencia real: } \frac{\text{Prevalencia aparente} + (\text{Especificidad} - 1)}{\text{Especificidad} + (\text{Sensibilidad} - 1)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

3.7.2 Sensibilidad y Especificidad

El cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos se realizó mediante el software estadístico WinEpi considerando como prueba estándar de referencia al diagnóstico microscópico. Su cálculo se detalla en las ecuaciones 3, 4, 5 y 6 en base a los datos de la Tabla 5.

Tabla 5.

Formato de tabla 2x2 para el cálculo de los porcentajes de sensibilidad y especificidad.

		Prueba estándar		
		Enfermo	Sano	Total
Prueba diagnóstica	Positivo	A	B	A+B
	Negativo	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	A+B+C+D

$$\text{Sensibilidad: } \frac{A}{A+C} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Especificidad: } \frac{D}{B+D} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{A}{A+C} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)} = \frac{D}{C+D} \quad (\text{Ecuación 6})$$

3.7.3 Prueba de McNemar

Se realizó una prueba de McNemar de discordancia para establecer una comparación de proporciones correlacionadas, es decir, poder identificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el diagnóstico proporcionado por la técnica molecular (PCR) y la técnica de microscopía para el género *Entamoeba spp.* Una vez detectado el microorganismo mediante el método en fresco se confirmó la presencia de *Entamoeba spp.* por microscopía directa. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Epi Info 7.

3.8 Planteamiento de hipótesis

Se planteó una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alternativa (H_1):

H_0 = No existen diferencias significativas entre la técnica molecular (PCR) y la técnica de microscopía directa para detección de *Entamoeba spp.* en muestras coprológicas

H_1 = Existen diferencias significativas entre la técnica molecular (PCR) y la técnica de microscopía para la detección de *Entamoeba spp.* en muestras coprológicas.

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1 Análisis de frecuencia de variables

De un total de 508 individuos estudiados en las tres regiones del Ecuador 49.21% fueron de sexo masculino y 50.79% de sexo femenino. La distribución por regiones y por edades de los niños incluidos en el estudio, se encuentran en la Tabla 6 y Tabla 7.

Tabla 6.

Distribución por regiones de los niños de estudio

<u>Región</u>	<u>Frecuencia</u>
Costa	29.33 %
Sierra	41.34 %
Oriente	29.33 %

Tabla 7.

Distribución por edades de los niños de estudio

<u>Edad</u>	<u>Frecuencia</u>
10	20.47 %
11	50.98 %
12	19.88 %
13	4.92 %
14	3.74 %

El grupo incluido para el desarrollo de la investigación fueron niños de edad escolar no menores de 10 años ni mayores de 14 debido a que la población de estudio se enfocó en niños que acuden a escuelas fiscales del Ecuador continental cursando el último año de educación básica basados en el

argumento mencionado por Jacobsen, Ribeiro, Quist y Rydbeck (2007), quienes plantean que se han realizado pocos estudios centrados en las áreas rurales y en niños de edad escolar.

4.2 Amplificación del fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.* mediante PCR punto final

Para la amplificación del fragmento del gen se utilizó el protocolo previamente mencionado en el apartado de metodología. A través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, se logró amplificar el fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.* en 211 de 508 muestras provenientes de la región Costa, Sierra y Oriente del Ecuador (Figura 5).

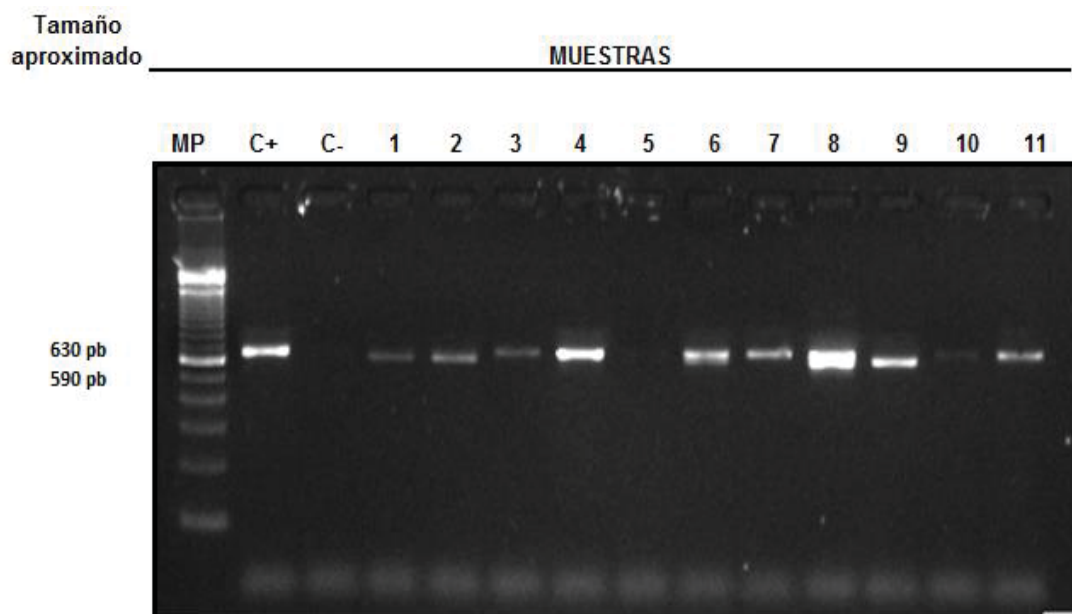


Figura 5. Amplificación de los fragmentos de 590 y 630 pb correspondientes al gen de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.* de 11 muestras escogidas en un gel de agarosa al 2%.

- a) Carril MP: Marcador de peso molecular (100 pb)
- b) Carril C+: Control positivo *Entamoeba spp.*
- c) Carril C -: Control negativo (Reacción sin templado de ADN)

- d) Carril 1, 2, 6, 8 y 9: Amplificación del fragmento de 590 pb.
- e) Carril 3, 4, 7,10 y 11: Amplificación del fragmento de 630 pb.

4.3 Diagnóstico por PCR

De un total de 508 muestras de heces estudiadas para la identificación de *Entamoeba spp.* mediante la técnica de PCR, se obtuvo un total de 40 muestras positivas para la región Costa, 87 en la región Sierra y 84 para la región Oriente. Esto reflejó un total de 211 muestras positivas.

La relación con el total de muestras analizadas y el número de muestras negativas se pueden observar en la figura 6.

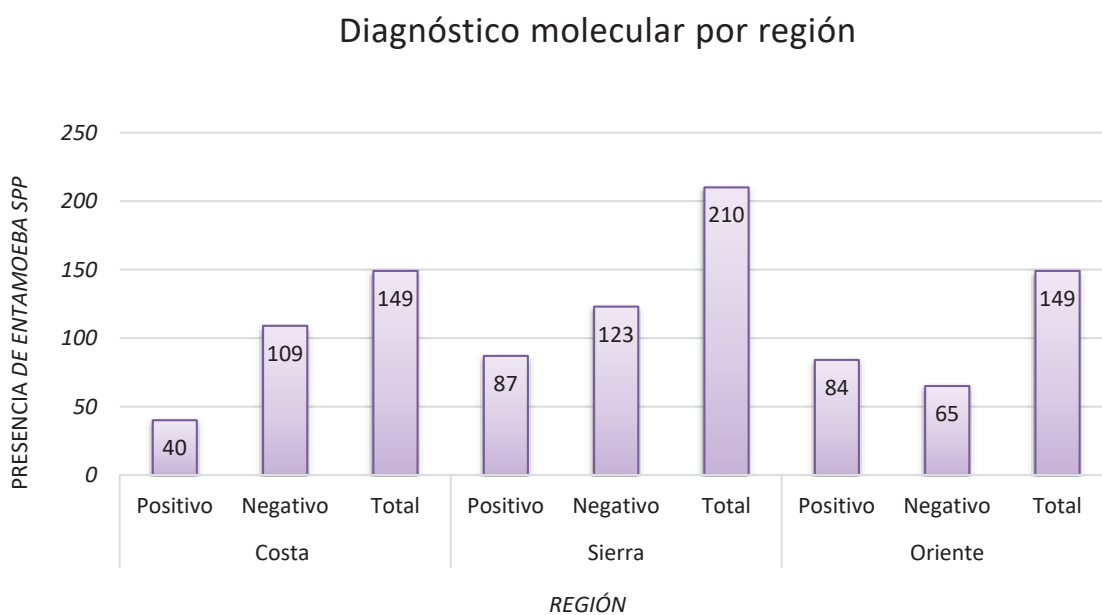


Figura 6. Presencia de *Entamoeba spp.* mediante PCR punto final en muestras coprológicas de niños escolares de séptimo año de educación básica por regiones de Ecuador continental.

4.4 Diagnóstico por microscopía

Dado que el diagnóstico por microscopía se realiza a nivel de especie y el diagnóstico por PCR a nivel de género, se sumaron las muestras positivas y negativas detectadas por microscopía sin importar la especie que provenía.

Por tanto, se obtuvieron 50 muestras positivas para *Entamoeba spp.* en la región Costa, 67 en la región Sierra y 72 en el Oriente, para un total de 189 muestras positivas. Asimismo, el diagnóstico negativo por microscopía reflejó 99 muestras para *Entamoeba spp.* en la región Costa, 143 en la región Sierra y 77 en el Oriente, sumando un total de 319 muestras negativas en las tres regiones de estudio. Los datos de microscopía fueron proporcionados por el proyecto 4 del programa PROPAD (Ver Tabla 8).

Tabla 8.

Número de muestras positivas y negativas totales para Entamoeba spp. por microscopía y PCR encontradas en muestras coprológicas de niños escolares por región de Ecuador continental.

	Método	No. de muestras examinadas	No. de positivos detectados	No. de negativos detectados
Región Costa	PCR	149	40	109
	Microscopía	149	50	99
Región Sierra	PCR	210	87	123
	Microscopía	210	67	143
Región Oriente	PCR	149	84	65
	Microscopía	149	72	77
Total	PCR	508	211	297
	Microscopía	508	189	319

Con estos resultados, el número de muestras detectadas como negativas por microscopía fue alto. Este dato se justifica dado que al ser una técnica que

depende directamente del operador, puede provocar confusión al detectar las estructuras de *Entamoeba spp.* Además, dependiendo de los estadios de los trofozoitos, éstos pueden asemejarse a las de quistes de otras especies, levaduras o leucocitos (Arsène Zongo et al., 2016).

Asimismo, se puede observar en la Tabla 8 que el número de positivos detectados por PCR fue superior al detectado por microscopía. Este resultado refleja que la complejidad de la muestra biológica con la que se trabajó, no influyó sobre la reacción de PCR (Arsène Zongo et al., 2016).

4.5 Correlación entre el criterio morfológico por microscopía y amplificación por PCR

Al analizar el resultado obtenido de la microscopía y PCR punto final para la detección de *Entamoeba spp.*, se encontró que de un total de 508 muestras analizadas por microscopía y PCR, únicamente 84 (16.5%) fueron diagnosticadas como positivas por ambas técnicas, mientras que 127 (25%) fueron positivas por PCR y 68 (13.4%) muestras resultaron positivas por microscopía; las restantes 229 muestras que representan el 45.1% fueron negativas en ambas técnicas.

Con estos resultados, la prueba de PCR mostró una sensibilidad del 55.3% y una especificidad del 64.3% con un valor predictivo positivo (VPP) de 39.8% y un valor predictivo negativo (VPN) de 77.1%. Todo esto tomando a la microscopía como prueba estándar de referencia (Ver Tabla 9).

Tabla 9.

Comparación de los resultados obtenidos por PCR y microscopía en la detección de *Entamoeba spp.*

	Microscopía				Total
	Presente		Ausente		
PCR	N	%	N	%	
Positivos	84	16.5	127	25	211
Negativos	68	13.4	229	45.1	297
Total	152	29.91	356	70.1	508
Sensibilidad	55.3 %	(95% IC: 47.4, 63.2%)			
Especificidad	64.3 %	(95% IC: 59.3, 69.3%)			
VPP	39.8 %				
VPN	77.1%				

Nota: PPV: Valor predictivo positivo; NVP: Valor predictivo negativo; IC: Índice de confianza. Prueba de Mc. Nemar (χ^2) =143; $p < 0.0001$. Nivel de significancia $p < 0.05$

En esta investigación al emplear a la microscopía como estándar de referencia, la sensibilidad y especificidad de la PCR fue del 55.3% y 64.3% respectivamente. Estos resultados demuestran que los bajos valores de sensibilidad y especificidad de la prueba molecular, pueden estar asociados a tres factores importantes: Uno es el estándar de referencia empleado en esta investigación (microscopía), el cual se justifica con el estudio realizado por Tanyuksel et al. (2003) acerca del diagnóstico de amebiasis. Dentro de sus resultados se determinó que la microscopía es la prueba con menor porcentaje de sensibilidad (60%) y especificidad (10-50%) respecto a la ELISA, PCR y análisis de isoenzimas.

El segundo factor que pudo afectar la sensibilidad del estándar de referencia fue el número de muestras biológicas analizadas por participante. Según Ravdin (1994) para lograr un 90% de sensibilidad en la microscopía para la detección de *Entamoeba spp.*, es necesario tomar tres muestras por individuo,

para analizar el comportamiento del parásito en diferentes tiempos y prevenir la incorrecta identificación de las amebas. El tomar únicamente una muestra provocaría que la tasa de falsos positivos sea más alta y se evidencie una reducción del 40% al 60% en la sensibilidad. Lamentablemente, obtener una muestra biológica seriada no fue posible en este estudio, por la limitación de recursos y el gran número de individuos evaluados dentro del programa PROPAD. Este argumento se puede corroborar con los resultados de las investigaciones realizadas por Roy, Kabir, Mondal, Ali y Petri (2005); Khan, Mirdha, Samantaray y Sharma (2006) y Yildiz Zeyrek et al. (2013) quienes al determinar la sensibilidad de la PCR utilizando la prueba de ELISA como estándar de referencia por su mejor rendimiento sobre la microscopía y cultivos. Se obtuvieron sensibilidades del 97%, 83% y 87% respectivamente. Estos resultados demuestran que hay un aumento en la sensibilidad de la PCR cuando se emplea otra prueba estándar, por ende, este argumento justifica la necesidad de buscar nuevas técnicas de verificación como la PCR que permitan obtener adecuados porcentajes de sensibilidad y especificidad.

Asimismo, el tercer factor engloba a la PCR como técnica que, a pesar de ser más específica y sensible, puede también presentar problemas de falsos positivos, provocados por la contaminación del ADN dentro de la reacción, baja especificidad de los cebadores empleados y el empleo de un excesivo número de ciclos que pueden ocasionar la amplificación de un ADN similar al deseado. La contaminación puede ser monitoreada con el uso de controles negativos. De igual forma, la presencia de falsos negativos en una PCR puede deberse a errores técnicos de laboratorio, donde se puede dar la degradación del ADN por fallas en la conservación de las muestras, escasa extracción del ADN y bajo rendimiento de los cebadores (Paxson, 2008). A pesar de que la muestra analizada contenga adecuadas concentraciones de ADN, la exposición de la reacción a componentes inhibidores como proteínas, sales biliares urea, heme y distintos microorganismos presentes en las muestras de heces, sangre, orina o tejidos; pueden afectar la amplificación del ADN de interés si no se llevó a cabo una adecuada extracción y purificación del producto (Gonçalves-de-

Albuquerque et al., 2014) Esto se puede prevenir mediante la inclusión de un control positivo y estándares internos.

Finalmente, la prueba de McNemar ($p=0.001$) demostró que efectivamente existen diferencias entre la técnica molecular (PCR) y la técnica de microscopía para la detección de *Entamoeba spp.* Sin embargo, el porcentaje de especificidad (64.3%) y valor predictivo negativo (77.1%) obtenido, reflejó que ambas pruebas concuerdan en un mayor número de muestras con un diagnóstico negativo de *Entamoeba spp.*, lo cual indica que probablemente las muestras analizadas no presentaron *Entamoeba*. No obstante, la PCR encontró más positivos (211) respecto a la microscopía (189), por lo que esta técnica podría ser más efectiva en la detección de *Entamoeba* que la microscopía.

4.6 Prevalencia aparente de *Entamoeba spp.* determinada por la amplificación del gen que codifica para la secuencia de la subunidad ribosomal menor de *Entamoeba spp.*

Los resultados del presente estudio reflejaron que la prevalencia real de *Entamoeba spp.* fue del 29.9% (95% IC: 25.9%, 33.9%), aunque la prueba diagnóstica evaluada mostró una prevalencia aparente del 41,5% (95% IC: 37.3%, 45. 8%) en las tres regiones del Ecuador. Este valor demuestra que la frecuencia de *Entamoeba*, en una población cuya prueba diagnóstica no fue muy precisa (sensibilidades o especificidades inferiores al 100%) se mantiene aún alta. Asimismo, para la franja poblacional analizada el Oriente fue la región con la prevalencia más alta (56,3 %) frente a la Sierra y Costa con el 41,9% y 26,2% respectivamente. En base a estos valores, se puede considerar que aún existe un alto nivel de contaminación fecal-oral, lo que se traduce en una calidad de vida y educación sanitaria deficiente en las poblaciones de este estudio.

Al analizar de manera individual la prevalencia de *Entamoeba spp.* por región, se encontró que el 41.9% observado en la Sierra, se asemeja al valor obtenido por Jacobsen et al. (2007) en su estudio de prevalencia de parásitos intestinales por microscopía en niños habitantes de áreas rurales de Chimborazo. En él obtuvo una prevalencia del complejo *E. histolytica/E. dispar* del 67.4% y la especie *Entamoeba coli* del 39.5 % para un total de 203 muestras. En base a ello, se puede señalar que la prevalencia de *Entamoeba spp.* obtenida en el presente estudio en la Sierra, no ha cambiado significativamente en el año 2017 comparado con los resultados de Jacobsen del año 2007. Esto por su parte, se contrapone con los resultados del estudio de Levecke et al. (2011) realizado de 16 comunidades rurales de Loja donde de total de 101 individuos analizados 79 (78.2%) de ellos se encontraban infectados por *Entamoeba spp.*, dicha prevalencia fue obtenida mediante PCR. Dado que la prevalencia de Levecke supera tres veces más al valor obtenido en la región Sierra del presente trabajo, sus resultados efectivamente no concuerdan a pesar de emplear la misma prueba molecular. Por lo que, las discrepancias en la prevalencia pueden deberse principalmente a las diferencias entre la población del estudio donde Levecke, se centró en individuos adultos con una edad media de 28 años y donde el análisis molecular se realizó únicamente en las muestras positivas por microscopía que contenían los quistes de *Entamoeba*, mas no en la totalidad de la población; a diferencia de lo realizado en el presente estudio que fue en una población infantil y el análisis se realizó en toda la población tanto para la técnica microscópica como para la técnica molecular.

La prevalencia del 26.8% obtenida en la región Costa mediante la aplicación de PCR punto final, se contrasta con la obtenida en el estudio de Rinne, Rodas, Galer-Unti, Glickman y Glickman (2005), donde se analizó la prevalencia de protozoos intestinales en 189 niños de edades entre los 1 y 10 años del cantón de Santa Ana- (Manabí) y se determinó que existe un 46.6 % de prevalencia para el complejo *E. dispar/ E. histolytica* mediante métodos coproparasitarios. La prevalencia obtenida mediante microscopía en aquel trabajo fue mucho

mayor a la obtenida por PCR en la presente investigación, lo que refleja que probablemente la infección en dicha comunidad era muy recurrente o el diagnóstico emitido estuvo sesgado, asumiendo la presencia del parásito en individuos que no los portaban.

La prevalencia de *Entamoeba spp.* en la región Oriente fue del 56.3%. Este dato fue comparado con el estudio de Quizhpe, San Sebastián, Hurtig y Llamas (2003), donde se evaluó la prevalencia de infecciones por parásitos en niños de edad escolar en dos cantones de la provincia de Orellana mediante microscopía. El autor señala que hay un 50.7% de niños infectados con *Entamoeba spp.* evidenciándose una mayor presencia de infección por la especie *Entamoeba coli* (30.3%) seguido del complejo complejo *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* con 20.5%. Al contrastar los resultados, se observa que la prevalencia de ambos estudios se asemeja, lo que indica una presencia constante de *Entamoeba* en la región Oriente. Asimismo, este trabajo se centró en dos cantones de la provincia de Orellana y Morona Santiago a diferencia del estudio de Quizhpe que trabajó únicamente en Orellana, sin embargo, se puede deducir que la población de la provincia de Orellana es un modelo para el estudio de parásitos como *Entamoeba* en el Oriente.

De un total de diez investigaciones centradas en el estudio de *Entamoeba spp.* (en especial *E. histolytica* y *E. dispar*) realizadas en zonas rurales y urbanas del Ecuador, seis de éstas se enfocaron en microscopía. Sus valores de prevalencia fueron muy altos y se encontraban centrados únicamente en las especies *E. dispar* y *E. histolytica*, descartando las especies no patógenas. Esto es un problema debido a que dicha prevalencia podría ser resultado de una sobreestimación, por la dificultad de identificar las diferencias morfológicas entre las distintas especies. Sumado a ello, no se han realizado suficientes estudios con técnicas moleculares como para determinar con exactitud la utilidad de estas técnicas en laboratorios de diagnóstico parasitológico en nuestro país.

Este estudio sirve de base para que investigaciones acerca de parásitos de gran importancia como *E. histolytica*, se realicen en el país y de esta forma se puedan incluir las técnicas moleculares como pruebas de diagnóstico rápido.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

A través de la técnica de PCR se logró amplificar el fragmento del gen de la subunidad ribosomal menor presente en las especies de *Entamoeba spp.*, en muestras de heces provenientes de niños y niñas de entre 10 y 14 años de las tres regiones del Ecuador.

La prueba de McNemar demostró que existen diferencias entre las técnicas de PCR y microscopía para la detección de *Entamoeba spp.* con un mayor número de positivos detectados por PCR respecto a la microscopía (sin especificar las especies).

El Oriente fue la región con mayor prevalencia aparente de *Entamoeba spp.* seguido de la región Sierra y Costa.

Utilizando como estándar de referencia la microscopía, la prueba de PCR presentó una baja sensibilidad y especificidad.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda que futuros estudios se centren en la diferenciación de las especies de *Entamoeba spp.* que tienen gran similitud morfológica como *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba histolytica*. Asimismo, ampliar el campo de estudio no solamente a niños y niñas con el rango de edad analizado sino también a niños menores de 5 años, personas adultas y adultos mayores para establecer una comparación de infecciones provocadas por *Entamoeba* en especial la especie patógena.

Se sugiere plantear estudios a futuro, que incluyan variables como la talla y el peso para poder correlacionar el efecto de las infecciones de *Entamoeba spp.* con la salud. También se sugiere contar con datos de las condiciones de vida de la población de estudio con la finalidad de plantear políticas de asistencia dirigidas hacia los sectores más sensibles.

Dentro del diagnóstico de amebiasis, una detección a nivel de complejo *E. dispar/histolytica/mohkovskii* es considerada como suficiente para emplear un tratamiento, tenga o no presencia del microorganismo patógeno. Por lo tanto, se recomienda determinar la gran importancia de utilizar técnicas como PCR para realizar una identificación completa del parásito de estudio y así emitir un adecuado diagnóstico que permita proveer un tratamiento acorde a la condición del individuo.

Referencias

- Acha, P. y Szyfres, B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre. Recuperado el 19 de septiembre de 2017 de <https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000300012>
- Ali, I. K. M., Clark, C. G., Petri, W. A. (2008). *Molecular epidemiology of amebiasis*. Recuperado el 29 de septiembre de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.004>
- Ali, I. K. M., Hossain, M. B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P. F., Petri, W. A., Haque, R. y Clark, C. G. (2003). *Entamoeba moshkovskii infections in children in Bangladesh*. Recuperado el 24 de septiembre de 2017 de <https://doi.org/10.3201/eid0905.020548>
- Arsène Zongo, W., Diagbouga, S., Ouermi, D., Rebeca Compoaré, T., Dorcas, O.-Y., Karim Ouattara, A. y Simporé, J. (2016). *Real Time PCR Assay in differentiating Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections in patients fecal samples attending St Camille hospital in Ouagadougou, Burkina Faso*. Recuperado el 20 de septiembre de 2017 de <http://crmb.aizeonpublishers.net/content/2016/6/crmb938-943.pdf>
- Asencio, L. (2006). Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. Recuperado el 13 de julio de 2017 de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v03n2/pdf/a09v03n2.pdf>
- Ash, L. R. y Orihel, T. C. (2010). Atlas de Parasitología Humana/ *Atlas of Human Parasitology*. Recuperado el 5 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=P70U9QRWDiwC>
- Bogitsh, B. J., Carter, C. E. y Oeltmann, T. N. (2005). *Human parasitology*. Recuperado el 3 de marzo de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=wFW_5CtoZykC
- Brennan, K. y Zheng, J. (2008). *Interleukin 8*. En Enna., S. J. y Bylund, D. B. (Eds.). Recuperado el 13 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61916-6>
- Brooke, M. M., Melvin, D. M. y Healy, G. R. (1983). Protozoarios intestinales comunes en humanos: Esquemas de los ciclos biológicos. Recuperado

- el 25 de marzo de 2017 de http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/PDF_Manuals/protozoa.pdf
- Burleigh, B. y Soldati, D. (Eds.). (2008). *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*. Recuperado el 14 de abril de 2017 de https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_18
- Cabello, R. R. (2007). Microbiología y parasitología humana : Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Recuperado el 23 de mayo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=Wv026CUhR6YC>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2016). *Intestinal Amebae*. Recuperado el 15 de septiembre 2017 de <https://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/index.html>
- Choi, B. y Kim, B. (2017). *Prevalence and Risk Factors of Intestinal Parasite Infection among Schoolchildren in the Peripheral Highland Regions of Huanuco, Peru*. Recuperado el 16 de febrero de 2017 de <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.5.03>
- Cruz-Reyes, A. y Camargo-Camargo, B. (2001). Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines. Recuperado el 14 de agosto de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=Hgj4bbEdyUgC>
- Davis, A. y Pawlowski, Z. S. (1985). *Amoebiasis and its control*. Recuperado el 22 de septiembre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536419/pdf/bullwho00086-0002.pdf>
- Delialioglu, N., Aslan, G., Sozen, M., Babur, C., Kanik, A. y Emekdas, G. (2004). *Detection of Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay*. Recuperado el 18 de marzo de 2017 de <https://doi.org/S0074-02762004000700019>
- ElBakri, A., Samie, A., Ezzedine, S. y Odeh, R. A. (2013). *Differential detection of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE)*. Recuperado el 15 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0128-8>

- Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. L. y Burton, G. R. W. (2011). *Burton's microbiology for the health sciences*. Recuperado el 26 de febrero de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=RaVKCQI75voC>
- Espinosa-Cantellano, M. y Martínez-Palomo, A. (2000). *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.318-331.2000>
- Espinosa Cantellano, M., Castanon Gutierrez, G. y Martinez-Palomo, A. (1997). *In vivo pathogenesis of Entamoeba dispar*. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033073>
- Faust, D. M. y Guillen, N. (2012). *Virulence and virulence factors in Entamoeba histolytica, the agent of human amoebiasis*. Recuperado el 19 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.013>
- Fleta Zaragoza, J., Bueno Lozano, O. y Bueno Lozano, M. (2000). Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. Recuperado el 13 de septiembre de 2017 de <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-amebiasis-intestinal-absceso-hepatico-amebiano-15325>
- Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. y Harkness, J. (2007). *Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species*. Recuperado el 11 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.1128/CMR.00004-07>
- Fox, J. G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C. E., Quimby, F. W. y Smith, A. (Eds.). (2006). *The Mouse in Biomedical Research: Diseases*. Recuperado el 29 de julio de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=MFQ_-ljb_ycC
- Gatti, S., Swierczynski, G., Robinson, F., Anselmi, M., Corrales, J., Moreira, J. y Scaglia, M. (2002). *Amebic infections due to the Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar complex: A study of the incidence in a remote rural area of Ecuador*. Recuperado el 15 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.123>
- Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Pessoa e Silva, R., de Moraes, R. C. S., Trajano-Silva, L. A. M., Régis-da-Silva, C. G., Brandão-Filho, S. P. y Paiva-Cavalcanti, M. (2014). *Tracking false-negative results in molecular*

- diagnosis: Proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis.* Recuperado el 21 de febrero de 2017 de <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-16>
- Gutiérrez-Cisneros, M. J., Cogollos, R., López-Vélez, R., Martín-Rabadán, P., Martínez-Ruiz, R., Subirats, M. y Fuentes, I. (2010). *Application of real-time PCR for the differentiation of Entamoeba histolytica and E. dispar in cyst-positive faecal samples from 130 immigrants living in Spain.* Recuperado el 17 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373759>
- Hall, J. E. y Guyton, A. C. (2007). *Compendio de fisiología médica.* (B. B. Serra, Ed.). Recuperado el 13 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=-Uqrq7fwDgsC>
- Haque, R., Kabir, M., Noor, Z., Rahman, S. M. M., Mondal, D., Alam, F., Petri, W. A. (2010). *Diagnosis of amebic liver abscess and amebic colitis by detection of Entamoeba histolytica DNA in blood, urine, and saliva by a real-time PCR assay.* Recuperado el 22 de diciembre de 2017 de <https://doi.org/10.1128/JCM.00152-10>
- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública [INSPI]. (s.f.). Determinar la prevalencia general de las parasitosis desatendidas en el Ecuador: protozoarios y helmintos (Proyecto 4). Recuperado el 14 de Febrero de 2017 de <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/propad/proyecto-4-determinar-la-prevalencia-de-las-parasitosis-desatendidas-en-el-ecuador-protozoarios-y-helmintos/>
- Issa, R. (2014). *Non-pathogenic protozoa.* Recuperado el 18 de Agosto de septiembre de 2017 de <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/viewFile/4593/1761>
- Jacobsen, K. H., Ribeiro, P. S., Quist, B. K. y Rydbeck, B. V. (2007). *Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador.* Recuperado el 15 de agosto de 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402182>
- Khairnar, K. y Parija, S. C. (2007). *A novel nested multiplex polymerase chain*

- reaction (PCR) assay for differential detection of Entamoeba histolytica, E. moshkovskii and E. dispar DNA in stool samples.* Recuperado el 18 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-47>
- Khan, U., Mirdha, B. R., Samantaray, J. C. y Sharma, M. P. (2006). *Detection of Entamoeba histolytica using polymerase chain reaction in pus samples from amebic liver abscess.* Recuperado el 12 de abril de 2017 de http://www.indianjgastro.com/IJG_pdf/march2006/icat06i2p55.pdf
- Kotpal, P. R. L. (2012). *Modern Text Book of Zoology: Invertebrates.* Recuperado el 19 de noviembre de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=JuuWIZ7Llb8C>
- Laude, A., Valot, S., Desoubeaux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C. y Morio, F. (2018). *Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of Giardia intestinalis, Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis and Entamoeba histolytica from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review.* Recuperado el 17 de febrero de <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.019>
- Levecke, B., Dreesen, L., Barrionuevo-Samaniego, M., Ortiz, W. B., Praet, N., Brandt, J. y Dorny, P. (2011). *Molecular differentiation of Entamoeba spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador.* Recuperado el 10 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.010>
- Moonah, S. N., Jiang, N. M. y Petri, W. A. (2013). *Host Immune Response to Intestinal Amebiasis.* Recuperado el 11 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003489>
- Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S. y Corcho-Berdugo, A. (2000). *Principales medidas en epidemiología.* Recuperado el 26 de mayo de <https://doi.org/10.1590/S0036-36342000000400009>
- Mosser, D. M. y Edwards, J. P. (2009). *Exploring the full spectrum of macrophage activation.* Recuperado el 17 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. (2009). *Microbiología médica.* Recuperado el 15 de enero de 2017 de

- <https://books.google.com.ec/books?id=GZ1-JI9Aml8C>
- Naranjo, T. T., Noguera-Salvá, R. y Guerrero, F. F. (2009). *Extracellular matrix: Morphology, function and biotensegrity (part I)*. Recuperado el 09 de octubre de 2017 de [https://doi.org/10.1016/S1699-8855\(09\)70192-8](https://doi.org/10.1016/S1699-8855(09)70192-8)
- Ngui, R., Angal, L., Fakhrurrazi, S. A., Lian, Y. L. A., Ling, L. Y., Ibrahim, J. y Mahmud, R. (2012). *Differentiating Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia*. Recuperado el 14 de febrero de 2017 de <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-187>
- Nozaki, T. y Bhattacharya, A. (Eds.). (2015). *Amebiasis: Biology and Pathogenesis of Entamoeba*. Recuperado el 18 de abril de 2017 de <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55200-0>
- Parenti, L. y Ebach, M. (2009). *Comparative Biogeography: Discovering and Classifying Biogeographical Patterns of a Dynamic Earth*. Recuperado el 05 de abril de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=K1GU_1I6bG4C&dq=endemism+concept&source=gbs_navlinks_s
- Parija, S. C., Mandal, J. y Ponnambath, D. K. (2014). *Laboratory methods of identification of Entamoeba histolytica and its differentiation from look-alike Entamoeba spp.* Recuperado el 15 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138535>
- Paul, J., Srivastava, S. y Bhattacharya, S. (2007). *Molecular methods for diagnosis of Entamoeba histolytica in a clinical setting: an overview*. Recuperado el 17 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.11.005>
- Paxson, J. (2008). *Polymerase Chain Reaction Test Interpretation*. Recuperado el 01 de diciembre de 2016 de https://vetfolio-vetstreet.s3.amazonaws.com/mmah/ba/e4d32bc0854d3ca002b1e4c3713fae/filePVE_03_04_186.pdf
- Pérez-Arellano, J., Carranza-Rodríguez, C., Vicente-Santiago, B. y Muro, A. (2010). *Amebosis, giardosis y tricomonosis*. Recuperado el 25 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70092-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70092-5)

- Ponce-Gordo, F. y Martínez-Díaz, R. A. (2010). *Taxonomy and phylogeny of Entamoeba species. An historical review*. Recuperado el 22 de Abril de 2017 de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133062850>
- Pritt, B. S. y Clark, C. G. (2008). *Amebiasis*. Recuperado el 18 de septiembre de 2017 de <https://doi.org/10.4065/83.10.1154>
- Quizhpe, E., San Sebastián, M., Hurtig, A. K. y Llamas, A. (2003). Prevalencia de anemia en escolares de la zona amazónica de Ecuador. Recuperado el 03 de septiembre de 2016 de <https://doi.org/10.1590/S1020-49892003000500003>
- Ralston, K. y Petri, W.A. (2011). *Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica*. Recuperado el 4 de septiembre de 2017 de <http://doi.org/10.1016/j.pt.2011.02.006>
- Ramana, K. y Kranti, P. (2012). *Conventional microscopy versus molecular and immunological methods in the diagnosis of amoebiasis*. Recuperado el 21 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.4103/2141-9248.105679>
- Ravdin. (1994). *Tropical infection of the gastrointestinal tract and liver series Diagnosis of invasive amoebiasis*. Recuperado el 08 de julio de 2017 de <http://gut.bmj.com/content/gutjnl/35/8/1018.full.pdf>
- Reyes, L. y León, R. (2002). Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. Recuperado el 13 de octubre de 2017 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482002000200006&nrm=iso
- Rinne, S., Rodas, E. J., Galer-Unti, R., Glickman, N. y Glickman, L. T. (2005). *Prevalence and risk factors for protozoan and nematode infections among children in an Ecuadorian highland community*. Recuperado el 14 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.01.003>
- Roy, S., Kabir, M., Mondal, D., Ali, I. K. M. y Petri, W. a. (2005). *Real-Time-PCR Assay for Diagnosis of Entamoeba histolytica Infection*. Recuperado el 05 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2168>
- Samie, A., ElBakri, A. y AbuOdeh, R. (2012). *Amoebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis*. Recuperado el 23 de diciembre de

- 2017 de <https://doi.org/10.5772/26810>
- Sard, B. G., Navarro, R. T. y Sanchis, J. G. (2011). Amebas intestinales no patógenas: una visión clinicoanalítica. Recuperado el 19 de septiembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70023-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70023-4)
- Sargeant, P. G., Williams, J. E. y Grene, J. D. (1978). *The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis*. Recuperado el 06 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90174-8)
- Sehgal, D., Bhattacharya, A. y Bhattacharya, S. (1996). *Pathogenesis of infection by Entamoeba histolytica*. Recuperado el 12 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1007/BF02703099>
- Tanyuksel, M. y Petri, W. A. (2003). *Laboratory Diagnosis of Amebiasis*. Recuperado el 06 de febrero de 2017 de <http://doi.org/10.1128/CMR.16.4.713-729.2003>
- Thompson, R. C. A. y Smith, A. (2011). Zoonotic enteric protozoa. Recuperado el 17 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.016>
- Trejos-Suárez, J. y Castaño-Osorio, J. C. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. Recuperado el 11 de septiembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70731-3](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70731-3)
- Verweij, J. J., Laeijendecker, D., Brienen, E. A. T., Van Lieshout, L. y Polderman, A. M. (2003). *Detection and Identification of Entamoeba Species in Stool Samples by a Reverse Line Hybridization Assay*. Recuperado el 24 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5041>
- Verweij, J. J., Polderman, A. M. y Clark, C. G. (2001). *Genetic Variation among Human Isolates of Uninucleated Cyst-Producing Entamoeba Species*. Recuperado el 19 de marzo de 2017 de <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1644>
- Villanueva, M. M. y Patiño, P. (2006). Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/694.pdf>

- Vinueza Osorio, P. T. (2015). Influencia de la parasitosis en el estado nutricional de niños en etapa escolar de 5 a 12 años de la Escuela «La Libertad» en la comunidad de Tanlahua. Recuperado el 09 de mayo de 2017 de [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7705/Tesis PaulinaVinueza.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/7705](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7705/Tesis%20PaulinaVinueza.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/7705)
- Willhoeft, U., Hamann, L. y Tannich, E. (1999). *A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in Entamoeba histolytica is present and positionally conserved but highly degenerated in Entamoeba dispar*. Recuperado el 13 de noviembre de 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531249>
- Wiser, M. (2010). *Protozoa and Human Disease*. (E. Owen, Ed.). Recuperado el 01 de marzo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=zjEWBAAAQBAJ>
- Yildiz Zeyrek, F., Turgay, N., Unver, A., Ustun, S., Akarca, U. y Toz, S. (2013). *Differentiation of Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar by the Polymerase Chain Reaction in Stool Samples of Patients with Gastrointestinal Symptoms in the Sanliurfa Province*. Recuperado el 18 de julio de 2017 de <https://doi.org/10.5152/tpd.2013.39>
- Yimer, M., Zenebe, Y., Mulu, W., Abera, B. y Saugar, J. M. (2017). *Molecular prevalence of Entamoeba histolytica/dispar infection among patients attending four health centres in north-west Ethiopia*. Recuperado el 09 de septiembre de 2016 de <https://doi.org/10.1177/0049475515627236>
- Zeibig, E. (2013). *Clinical Parasitology: A Practical Approach*. Recuperado el 14 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.2105/AJPH.28.1.95>
- Zibaei, M., Firoozeh, F. y Azargoon, A. (2012). *Infantile Amoebiasis: A Case Report*. Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://doi.org/10.1155/2012/614398>

ANEXOS

Anexo 1.

Código de muestras región Costa y su diagnóstico de Entamoeba spp estimado por PCR.

Código	Edad	Sexo	Cantón	Resultado PCR
1	11	Femenino	EL EMPALME	Positivo
2	11	Masculino	EL EMPALME	Negativo
3	10	Femenino	EL EMPALME	Negativo
4	11	Femenino	EL EMPALME	Negativo
5	10	Femenino	EL EMPALME	Negativo
6	10	Femenino	EL EMPALME	Negativo
7	11	Femenino	EL EMPALME	Negativo
8	11	Masculino	EL EMPALME	Negativo
9	10	Masculino	BUENA FE	Positivo
10	11	Masculino	BUENA FE	Positivo
11	11	Femenino	BUENA FE	Negativo
12	10	Masculino	BUENA FE	Negativo
13	10	Femenino	BUENA FE	Positivo
14	11	Femenino	BUENA FE	Negativo
15	14	Masculino	BUENA FE	Negativo
16	10	Masculino	BUENA FE	Negativo
17	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
18	13	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo
19	12	Femenino	PUEBLO VIEJO	Negativo
20	10	Femenino	PUEBLO VIEJO	Positivo
21	10	Femenino	PUEBLO VIEJO	Negativo
22	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Negativo
23	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo
24	10	Femenino	PUEBLO VIEJO	Negativo
25	11	Femenino	URDANETA	Negativo
26	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo

27	11	Femenino	URDANETA	Positivo
28	10	Masculino	URDANETA	Positivo
29	11	Masculino	URDANETA	Positivo
30	10	Masculino	URDANETA	Positivo
31	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo
32	12	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
33	14	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
34	14	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
35	10	Masculino	NARANJITO	Negativo
36	11	Masculino	NARANJITO	Negativo
37	11	Femenino	NARANJITO	Negativo
38	10	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
39	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
40	10	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
41	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
42	11	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
43	11	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
44	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
45	13	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
46	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
47	10	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
48	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
49	11	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
50	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
51	11	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
52	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
53	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
54	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
55	10	Masculino	BAQUERIZO MORENO	Negativo
56	11	Masculino	BAQUERIZO MORENO	Negativo
57	10	Femenino	BAQUERIZO MORENO	Negativo
58	13	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
59	11	Masculino	ESMERALDAS	Positivo
60	11	Masculino	ESMERALDAS	Positivo
61	11	Femenino	ESMERALDAS	Positivo
62	11	Masculino	ATACAMES	Negativo
63	10	Femenino	ESMERALDAS	Positivo

64	11	Femenino	ESMERALDAS	Positivo
65	11	Masculino	ESMERALDAS	Positivo
66	10	Femenino	ESMERALDAS	Positivo
67	14	Femenino	ESMERALDAS	Positivo
68	13	Masculino	ATACAMES	Positivo
69	11	Femenino	ATACAMES	Negativo
70	11	Femenino	ATACAMES	Positivo
71	14	Masculino	PICHINCHA	Negativo
72	12	Femenino	PICHINCHA	Negativo
73	14	Femenino	PICHINCHA	Negativo
74	11	Masculino	PICHINCHA	Negativo
75	10	Masculino	PICHINCHA	Positivo
76	10	Masculino	PICHINCHA	Negativo
77	11	Masculino	PICHINCHA	Positivo
78	10	Femenino	PICHINCHA	Positivo
79	14	Masculino	PICHINCHA	Negativo
80	13	Masculino	PICHINCHA	Positivo
81	12	Masculino	PICHINCHA	Negativo
82	10	Masculino	PICHINCHA	Negativo
83	11	Femenino	PICHINCHA	Negativo
84	11	Femenino	PICHINCHA	Negativo
85	12	Masculino	PICHINCHA	Negativo
86	11	Femenino	JARAMIJO	Positivo
87	13	Femenino	JARAMIJO	Negativo
88	12	Femenino	JARAMIJO	Negativo
89	13	Femenino	JARAMIJO	Negativo
90	10	Masculino	JARAMIJO	Negativo
91	12	Femenino	JARAMIJO	Negativo
92	11	Femenino	JARAMIJO	Negativo
93	12	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo
94	14	Masculino	PUEBLO VIEJO	Positivo
95	10	Femenino	PUEBLO VIEJO	Negativo
96	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Negativo
97	11	Femenino	BUENA FE	Negativo
98	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
99	10	Femenino	BUENA FE	Negativo
100	10	Femenino	BUENA FE	Negativo

101	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
102	10	Femenino	BUENA FE	Negativo
103	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
104	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
105	12	Masculino	BUENA FE	Negativo
106	11	Masculino	BUENA FE	Negativo
107	12	Masculino	BUENA FE	Negativo
108	12	Femenino	BUENA FE	Negativo
109	12	Masculino	BUENA FE	Negativo
110	14	Femenino	BUENA FE	Negativo
111	12	Masculino	BUENA FE	Negativo
112	12	Femenino	BUENA FE	Negativo
113	14	Femenino	BUENA FE	Negativo
114	11	Femenino	BABAHOYO	Negativo
115	11	Femenino	BABAHOYO	Negativo
116	12	Femenino	BABAHOYO	Negativo
117	11	Femenino	BABAHOYO	Negativo
118	12	Femenino	BABAHOYO	Negativo
119	11	Masculino	URDANETA	Negativo
120	10	Femenino	URDANETA	Positivo
121	14	Masculino	URDANETA	Negativo
122	11	Femenino	URDANETA	Negativo
123	11	Femenino	PUEBLO VIEJO	Negativo
124	11	Masculino	PUEBLO VIEJO	Negativo
125	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
126	12	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
127	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
128	12	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
129	11	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
130	11	Femenino	GUAYAQUIL	Positivo
131	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
132	12	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
133	10	Femenino	GUAYAQUIL	Positivo
134	13	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
135	11	Masculino	GUAYAQUIL	Positivo
136	10	Femenino	GUAYAQUIL	Positivo
137	11	Femenino	GUAYAQUIL	Positivo
138	11	Femenino	NARANJITO	Positivo

139	10	Femenino	NARANJITO	Positivo
140	11	Masculino	NARANJITO	Negativo
141	11	Masculino	NARANJITO	Positivo
142	10	Masculino	NARANJITO	Negativo
143	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
144	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
145	11	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
146	12	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
147	14	Femenino	GUAYAQUIL	Negativo
148	12	Masculino	GUAYAQUIL	Negativo
149	13	Femenino	GUAYAQUIL	Positivo

Anexo 2.

Código de muestras región Sierra y su diagnóstico de Entamoeba spp estimado por PCR.

Código	Edad	Sexo	Cantón	Resultado PCR
1	11	Femenino	QUITO	Negativo
2	11	Masculino	ANTONIO ANTE	Negativo
3	10	Masculino	ANTONIO ANTE	Negativo
4	11	Femenino	ANTONIO ANTE	Negativo
5	11	Masculino	ANTONIO ANTE	Negativo
6	11	Masculino	ANTONIO ANTE	Positivo
7	10	Masculino	ANTONIO ANTE	Negativo
8	11	Femenino	ANTONIO ANTE	Positivo
9	10	Femenino	ANTONIO ANTE	Negativo
10	11	Femenino	ANTONIO ANTE	Negativo
11	11	Femenino	ANTONIO ANTE	Negativo
12	11	Masculino	ANTONIO ANTE	Positivo

13	11	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
14	13	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
15	12	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
16	11	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
17	11	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
18	12	Femenino	SANTA ISABEL	Negativo
19	14	Femenino	SANTA ISABEL	Positivo
20	11	Femenino	QUITO	Negativo
21	11	Femenino	QUITO	Negativo
22	11	Femenino	QUITO	Positivo
23	11	Masculino	QUITO	Negativo
24	11	Femenino	QUITO	Negativo
25	11	Femenino	QUITO	Negativo
26	12	Femenino	QUITO	Positivo
27	12	Femenino	QUITO	Positivo
28	11	Masculino	CAYAMBE	Positivo
29	11	Masculino	CAYAMBE	Positivo
30	11	Femenino	CAYAMBE	Negativo
31	11	Femenino	CAYAMBE	Positivo
32	11	Femenino	CAYAMBE	Positivo
33	12	Femenino	CAYAMBE	Negativo
34	11	Femenino	CAYAMBE	Negativo
35	11	Femenino	CAYAMBE	Positivo
36	11	Masculino	QUITO	Negativo
37	11	Femenino	QUITO	Negativo
38	11	Femenino	QUITO	Negativo
39	11	Masculino	CUENCA	Negativo
40	12	Masculino	CUENCA	Positivo
41	11	Masculino	CUENCA	Positivo
42	11	Masculino	CUENCA	Negativo
43	11	Masculino	CUENCA	Negativo
44	11	Masculino	CUENCA	Negativo
45	11	Masculino	CUENCA	Negativo
46	11	Masculino	CUENCA	Negativo

47	11	Masculino	CUENCA	Negativo
48	11	Masculino	CUENCA	Negativo
49	10	Masculino	CUENCA	Positivo
50	11	Masculino	CUENCA	Negativo
51	12	Masculino	CUENCA	Negativo
52	11	Masculino	CUENCA	Negativo
53	10	Masculino	CUENCA	Negativo
54	11	Masculino	CUENCA	Negativo
55	11	Femenino	CUENCA	Negativo
56	11	Masculino	CUENCA	Negativo
57	14	Masculino	CUENCA	Negativo
58	11	Masculino	QUITO	Negativo
59	12	Masculino	QUITO	Positivo
60	10	Masculino	QUITO	Negativo
61	11	Masculino	QUITO	Positivo
62	10	Masculino	QUITO	Negativo
63	11	Masculino	RUMIÑAHUI	Positivo
64	11	Femenino	RUMIÑAHUI	Positivo
65	12	Femenino	RUMIÑAHUI	Negativo
66	10	Femenino	RUMIÑAHUI	Negativo
67	11	Masculino	QUITO	Positivo
68	11	Femenino	QUITO	Positivo
69	11	Masculino	QUITO	Negativo
70	11	Masculino	QUITO	Negativo
71	11	Masculino	QUITO	Positivo
72	11	Masculino	QUITO	Positivo
73	10	Masculino	QUITO	Negativo
74	11	Masculino	QUITO	Positivo
75	11	Masculino	QUITO	Negativo
76	11	Femenino	QUITO	Positivo
77	11	Masculino	QUITO	Negativo
78	11	Masculino	QUITO	Positivo
79	10	Masculino	QUITO	Negativo
80	11	Femenino	QUITO	Positivo
81	10	Femenino	QUITO	Positivo
82	11	Masculino	QUITO	Negativo
83	11	Femenino	QUITO	Negativo
84	11	Femenino	QUITO	Negativo
85	10	Femenino	QUITO	Negativo
86	11	Masculino	QUERO	Positivo

87	11	Femenino	QUERO	Negativo
88	11	Masculino	QUERO	Positivo
89	11	Masculino	QUERO	Positivo
90	11	Femenino	QUERO	Positivo
91	11	Masculino	QUERO	Positivo
92	11	Femenino	QUERO	Positivo
93	11	Femenino	QUERO	Positivo
94	11	Femenino	QUERO	Positivo
95	11	Femenino	QUERO	Negativo
96	11	Masculino	CUENCA	Negativo
97	11	Femenino	CUENCA	Negativo
98	11	Femenino	CUENCA	Negativo
99	11	Femenino	CUENCA	Negativo
100	11	Femenino	CUENCA	Negativo
101	11	Masculino	CUENCA	Positivo
102	11	Masculino	CUENCA	Positivo
103	10	Femenino	CUENCA	Positivo
104	11	Masculino	CUENCA	Negativo
105	10	Masculino	CUENCA	Negativo
106	11	Femenino	CUENCA	Negativo
107	14	Femenino	CUENCA	Positivo
108	10	Femenino	CUENCA	Positivo
109	11	Masculino	CUENCA	Negativo
110	13	Femenino	CUENCA	Negativo
111	11	Masculino	ALASI	Negativo
112	11	Masculino	ALASI	Negativo
113	11	Femenino	ALASI	Negativo
114	11	Masculino	ALASI	Negativo
115	11	Masculino	ALASI	Negativo
116	10	Masculino	ALASI	Negativo
117	10	Femenino	ALASI	Negativo
118	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
119	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
120	10	Masculino	SALCEDO	Positivo
121	10	Masculino	SALCEDO	Positivo
122	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
123	12	Masculino	SALCEDO	Negativo
124	11	Femenino	SALCEDO	Negativo
125	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
126	10	Masculino	SALCEDO	Negativo

127	10	Femenino	SALCEDO	Negativo
128	11	Femenino	SALCEDO	Negativo
129	12	Masculino	SALCEDO	Negativo
130	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
131	11	Masculino	SALCEDO	Negativo
132	11	Femenino	SALCEDO	Negativo
133	11	Femenino	SALCEDO	Negativo
134	10	Femenino	SALCEDO	Negativo
135	11	Femenino	SALCEDO	Negativo
136	10	Femenino	SALCEDO	Positivo
137	10	Masculino	SALCEDO	Positivo
138	11	Femenino	SALCEDO	Positivo
139	10	Femenino	SALCEDO	Positivo
140	10	Femenino	SALCEDO	Negativo
141	11	Femenino	SALCEDO	Positivo
142	11	Masculino	SALCEDO	Positivo
143	11	Masculino	SALCEDO	Positivo
144	12	Femenino	RIOBAMBA	Positivo
145	11	Femenino	RIOBAMBA	Positivo
146	11	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
147	11	Femenino	RIOBAMBA	Positivo
148	11	Femenino	RIOBAMBA	Positivo
149	11	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
150	11	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
151	10	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
152	11	Femenino	RIOBAMBA	Positivo
153	12	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
154	11	Masculino	RIOBAMBA	Positivo
155	12	Femenino	RIOBAMBA	Negativo
156	11	Masculino	GUANO	Positivo
157	10	Masculino	GUANO	Negativo
158	10	Masculino	GUANO	Negativo
159	12	Femenino	GUANO	Negativo
160	12	Femenino	GUANO	Negativo
161	12	Femenino	GUANO	Positivo
162	12	Femenino	GUANO	Positivo
163	11	Femenino	GUANO	Positivo
164	10	Masculino	GUANO	Negativo
165	11	Masculino	GUANO	Negativo
166	10	Masculino	GUANO	Positivo

167	10	Masculino	GUANO	Positivo
168	12	Femenino	GUANO	Positivo
169	12	Masculino	GUANO	Positivo
170	11	Femenino	GUANO	Positivo
171	10	Femenino	GUANO	Positivo
172	10	Masculino	GUANO	Positivo
173	10	Masculino	GUANO	Negativo
174	10	Masculino	GUANO	Negativo
175	11	Masculino	GUANO	Negativo
176	10	Masculino	GUANO	Negativo
177	10	Femenino	GUANO	Positivo
178	10	Masculino	GUANO	Positivo
179	12	Femenino	GUANO	Positivo
180	14	Masculino	GUANO	Positivo
181	13	Femenino	GUANO	Negativo
182	13	Femenino	GUANO	Positivo
183	12	Masculino	GUANO	Positivo
184	11	Femenino	GUANO	Positivo
185	11	Femenino	GUANO	Positivo
186	12	Masculino	GUANO	Positivo
187	12	Femenino	GUANO	Positivo
188	13	Femenino	GUANO	Positivo
189	13	Femenino	GUANO	Negativo
190	12	Femenino	GUANO	Positivo
191	12	Femenino	GUANO	Positivo
192	12	Femenino	PEDRO VM	Positivo
193	12	Masculino	PEDRO VM	Positivo
194	14	Femenino	PEDRO VM	Negativo
195	12	Masculino	PEDRO VM	Negativo
196	12	Femenino	PEDRO VM	Negativo
197	12	Masculino	PEDRO VM	Negativo
198	11	Femenino	PEDRO VM	Negativo
199	12	Femenino	PEDRO VM	Negativo
200	10	Masculino	PEDRO VM	Negativo
201	10	Masculino	PEDRO VM	Negativo
202	11	Masculino	PEDRO VM	Negativo
203	10	Femenino	PEDRO VM	Negativo
204	14	Femenino	PEDRO VM	Negativo
205	12	Masculino	PEDRO VM	Negativo
206	11	Femenino	PEDRO VM	Negativo

207	11	Femenino	PEDRO VM	Negativo
208	11	Femenino	PEDRO VM	Negativo
209	11	Femenino	PEDRO VM	Negativo
210	11	Masculino	JOEL DAVID BASTIDAS BUENAÑO	Negativo

Anexo 3.

Código de muestras región Oriente y su diagnóstico de Entamoeba spp estimado por PCR.

Código	Edad	Sexo	Cantón	Resultado PCR
1	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
2	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
3	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
4	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
5	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
6	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
7	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
8	10	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
9	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
10	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo

11	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
12	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
13	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
14	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
15	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
16	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
17	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
18	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
19	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
20	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
21	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
22	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
23	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
24	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
25	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
26	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo

27	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
28	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
29	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
30	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
31	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
32	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
33	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
34	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
35	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
36	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
37	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
38	12	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
39	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
40	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
41	10	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
42	13	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo

43	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
44	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
45	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
46	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
47	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
48	10	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
49	10	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
50	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
51	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
52	12	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
53	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo
54	12	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
55	10	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
56	11	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
57	11	Femenino	JOYA DE LOS SACHAS	Negativo
58	12	Masculino	JOYA DE LOS SACHAS	Positivo

59	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
60	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
61	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
62	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
63	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
64	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
65	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
66	10	Femenino	LOGROÑO	Negativo
67	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
68	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
69	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
70	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
71	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
72	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
73	10	Masculino	LOGROÑO	Negativo
74	13	Masculino	LOGROÑO	Negativo
75	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
76	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
77	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
78	11	Masculino	LOGROÑO	Negativo
79	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
80	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
81	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
82	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
83	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
84	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
85	10	Femenino	LOGROÑO	Negativo
86	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
87	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
88	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
89	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
90	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
91	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
92	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
93	10	Femenino	LOGROÑO	Positivo
94	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
95	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
96	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
97	10	Femenino	LOGROÑO	Positivo
98	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
99	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
100	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
101	14	Femenino	LOGROÑO	Positivo

102	13	Masculino	LOGROÑO	Negativo
103	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
104	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
105	12	Masculino	LOGROÑO	Negativo
106	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
107	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
108	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
109	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
110	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
111	13	Masculino	LOGROÑO	Positivo
112	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
113	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
114	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
115	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
116	10	Femenino	LOGROÑO	Negativo
117	12	Femenino	LOGROÑO	Positivo
118	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
119	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
120	10	Femenino	LOGROÑO	Positivo
121	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
122	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
123	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
124	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
125	10	Femenino	LOGROÑO	Positivo
126	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
127	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
128	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
129	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
130	13	Masculino	LOGROÑO	Negativo
131	12	Femenino	LOGROÑO	Negativo
132	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
133	13	Masculino	LOGROÑO	Positivo
134	13	Masculino	LOGROÑO	Positivo
135	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
136	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
137	10	Masculino	MORONA	Positivo
138	10	Masculino	LOGROÑO	Positivo
139	11	Femenino	LOGROÑO	Negativo
140	13	Masculino	LOGROÑO	Positivo
141	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
142	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo
143	11	Femenino	LOGROÑO	Positivo
144	11	Masculino	LOGROÑO	Positivo

145	13	Femenino	LOGROÑO	Positivo
146	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
147	12	Masculino	LOGROÑO	Positivo
148	10	Masculino	PUEBLO VIEJO	Negativo
149	13	Femenino	LOGROÑO	Positivo

Anexo 4.

Permiso del Ministerio de Salud del Ecuador, para la ejecución del proyecto 3 del programa PROPAD.



Ministerio de Salud Pública
Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud



Memorando Nro. MSP-CGDES-2014-0473

Quito, D.M., 07 de julio de 2014

PARA: Sr. Ing. Edison Santiago Apunte Castillo
Director Ejecutivo INSPI

ASUNTO: Notificando autorización de la ejecución del Proyecto 3 PROPAD: "Estandarización e implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico y profilaxis temprana de las parasitosis desatendidas en el Ecuador".

Referencia: Proyecto 3 PROPAD: "Estandarización e implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico y profilaxis temprana de las parasitosis desatendidas en el Ecuador".

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo. La presente se emite en respuesta al Memorando Nro. MSP-INSPI-2014-0341-MEM del 25 de junio de 2014 por el cual se remite para consideración y análisis las respuestas a las observaciones planteadas mediante Memorando Nro. MSP-CGDES-2014-0424 del 20 de junio de 2014 en relación al protocolo de la referencia. Una vez analizada la documentación recibida se le comunica que todas las observaciones han sido solventadas.

Basado en lo anterior, se "AUTORIZA" la ejecución del proyecto referenciado. Es obligación del promotor de este estudio remitir informes de avance que la Autoridad Sanitaria Nacional podrá solicitarle en el transcurso de la ejecución de la investigación, así como el Informe Final y una copia de la publicación del o los artículos científicos derivadas de esta investigación.

Con sentimientos de consideración y estima

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Sra. Econ. Tatiana Margarita Villacres Landeta
COORDINADORA GENERAL DE DESARROLLO ESTRATÉGICO EN SALUD

Referencias:
- MSP-INSPI-2014-0341-MEM

Anexo 5.

Informe del Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de las Américas (CEBE-UDLA).

D. M. Quito 20 de junio de 2017

Daniela Alejandra Muñoz Tapia
Investigadora

De mis consideraciones:

Por medio de la presente el Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las Américas (CEBE-UDLA) le informa que el protocolo, autorizaciones y consentimiento informado del proyecto de titulación "**Detección molecular de *Entamoeba sp.* en población infantil de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador, entre los 10-14 años de edad mediante reacción en cadena de la polimerasa**", con fecha de hoy 20 de junio de 2017, han sido conocidos por el Presidente del Comité.

El proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Central del Ecuador y de la Coordinación Nacional de Desarrollo Estratégico en Salud del Ministerio de Salud Pública.

El Comité de Ética y Bioética para la Investigación a solicitud de la investigadora y dentro del ámbito de su competencia, ha asignado el siguiente código: 2017-0602.

En toda correspondencia con el Comité de Ética y Bioética para la Investigación sobre el proyecto, favor referirse al código asignado.

Los documentos han sido entregados al Comité y reposarán en su archivo por el tiempo determinado por la ley.

La investigadora asume la veracidad y corrección de los documentos entregados.

Atentamente,

Diego R. Chauvin P.
Presidente del CEBE-UDLA

