



Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.  
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), Noviembre-Diciembre 2025,  
Volumen 9, Número 6.

[https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v9i6](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i6)

# **BIOLOGÍA MOLECULAR UNA ALTERNATIVA DIAGNÓSTICA EFICAZ EN EL ESTUDIO DE LA GEOHELMINTOSIS**

**MOLECULAR BIOLOGY: AN EFFECTIVE DIAGNOSTIC  
ALTERNATIVE IN THE STUDY OF GEOHELMINTHIASIS**

**Diana Carolina González-Palacios**  
Universidad Técnica de Ambato, Ecuador

**José Roberto Hernández Caicedo**  
Universidad Técnica de Ambato, Ecuador

DOI: [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v9i6.21689](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i6.21689)

## Biología Molecular una Alternativa Diagnóstica Eficaz en el Estudio de la Geohelmintosis

**Diana Carolina González-Palacios<sup>1</sup>**[dc.gonzalez@uta.edu.ec](mailto:dc.gonzalez@uta.edu.ec),<https://orcid.org/0000-0002-9550-2884>Universidad Técnica de Ambato, Facultad  
Ciencias de la Salud. Ambato, Ecuador.**José Roberto Hernández Caicedo**[hernandezcjosser@gmail.com](mailto:hernandezcjosser@gmail.com)<https://orcid.org/0000-0001-6366-6449>Universidad Técnica de Ambato  
Ambato - Ecuador

### RESUMEN

La identificación de parasitosis desatendidas ha sido un importante problema de salud pública debido a su bajo límite de detección con metodología tradicional. El uso de herramientas moleculares en el diagnóstico ha permitido incrementar el límite de detección otorgando un resultado más certero y permitiendo la detección temprana de estas infecciones. Bajo este contexto, la presente revisión bibliográfica plasma las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de cinco parasitosis *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, importantes por su impacto en la población y por su subestimación en prevalencia

**Palabras claves:** pcr, detección molecular, *ancylostoma duodenale*, *ascaris lumbricoides*, *angiostrongylus cantonensis*, *necator americanus*, *strongyloides stercoralis*

---

<sup>1</sup> Autor principal

Correspondencia: [dc.gonzalez@uta.edu.ec](mailto:dc.gonzalez@uta.edu.ec)

# Molecular Biology: an Effective Diagnostic Alternative in the Study of Geohelminthiasis

## ABSTRACT

The identification of neglected parasitic infections has been a significant public health problem due to the low detection limit using traditional methods. The use of molecular diagnostic tools has increased the detection limit, providing more accurate results and enabling the early detection of these infections. In this context, this literature review presents the molecular techniques used to identify five parasitic infections: *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Necator americanus*, and *Strongyloides stercoralis*. These infections are important due to their impact on the population and their underestimated prevalence

**Keywords:** pcr, molecular detection, ancylostoma duodenale, ascaris lumbricoides, angiostrongylus cantonensis, necator americanus, strongyloides stercoralis

*Artículo recibido 8 noviembre 2025*

*Aceptado para publicación: 15 diciembre 2025*



## **INTRODUCCIÓN**

Los helmintos transmitidos por el suelo (geohelmintos) se encuentran ampliamente diseminados en zonas tropicales y subtropicales del mundo, con principal impacto en países en vías de desarrollo donde es común encontrar áreas desatendidas con medidas deficientes de saneamiento [1], [2]. Según datos de la OMS, en el mundo hay alrededor de dos mil millones de personas infectadas con geohelmintos [3]. La infección con geohelmintos se ha reportado con mayor prevalencia en niños y población vulnerable. Las manifestaciones clínicas que presentan este tipo de infestaciones varían entre deficiencia nutricional, anemia y trastornos intestinales y/o cognitivos. Este tipo de parasitosis pueden mantenerse asintomáticas por un largo período de tiempo, que a nivel de salud pública repercute en una estimación irreal de la prevalencia ocasionando la falta de tratamiento oportuno que en casos extremos puede comprometer la vida del paciente.

Con este antecedente, se resalta la importancia en el uso de métodos de diagnóstico que permitan la detección oportuna y eficiente de estas parasitosis. Los métodos de parasitología tradicional: concentración, microscopía y cultivo, han sido ampliamente reportados para el tamizaje poblacional. Sin embargo, la baja sensibilidad y especificidad reportada con estas técnicas compromete la fidelidad de los resultados promoviendo la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico [4]–[7]. La aplicación de tecnología basada en identificación de ADN ha permitido superar estas limitaciones. El uso de un marcador molecular apropiado y su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha posicionado como una alternativa interesante no solo por su alta especificidad y sensibilidad sino también por su relativo bajo costo [8]–[10].

El objetivo de esta revisión bibliográfica consiste en realizar un compendio de las técnicas moleculares utilizadas a nivel mundial para la identificación y diagnóstico de cinco parasitosis desatendidas, destacadas por su importante impacto en salud pública.

## **METODOLOGÍA**

La información científica incluida en este artículo de revisión fue obtenida de la base de datos de US National Library of Medicine National Institutes of Health, PMC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>). Las palabras claves empleadas para limitar la búsqueda fueron: Molecular, detection, diagnosis, PCR,



*Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*.

**Uncinariasis:** *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*

La Uncinariasis se encuentra entre las infecciones humanas crónicas de mayor relevancia a nivel mundial, se estima que aproximadamente 740 millones de personas se encuentran infestadas [11], siendo los países pobres y en vías de desarrollo los más afectados con aproximadamente 576 millones de infecciones[12], [13]. Esta condición es causada principalmente por los parásitos intestinales *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*. El ciclo biológico de estos nematodos se origina a partir de huevos que maduran en el suelo, los cual se desarrollan a larvas rhabditiformes y a larvas filariformes en condiciones adecuadas. Esta última corresponde a su forma infectante, la cual atraviesa la piel humana llegan al torrente sanguíneo, alcanza a los pulmones, perfora la cavidad alveolar, asciende por la tráquea y es deglutida descendiendo hasta el intestino delgado en donde se desarrolla a su estado adulto adhiriéndose a la pared intestinal y alimentándose del flujo sanguíneo. Esto contribuye al desarrollo de anemia, déficit de hierro, problemas del corazón, trastornos cognitivos y déficit de crecimiento, es así que los niños en edad escolar se consideran el grupo más vulnerable dentro de la Uncinariasis [14], [15]. Esta parasitosis se convierte en la segunda infección parasitaria más importante después de la malaria, al evaluar el tiempo de invalidez por años de vida en población general [16].

El diagnóstico de Uncinariasis ha dependido tradicionalmente de la detección de huevos en muestras fecales [17], sin embargo debido a la similitud morfológica entre los huevos de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* la diferenciación por microscopía se ve limitada. La importancia de su identificación para fines epidemiológicos y de tratamiento ha llevado a la aplicación de métodos de diagnóstico molecular, convirtiéndola en una alternativa efectiva debido a su sensibilidad y especificidad. Las principales tecnologías moleculares para el diagnóstico de la Uncinariasis son:

*Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)*

En 1998 Monti y colaboradores desarrollaron una técnica de diagnóstico para diferenciar *N. americanus* y *A. duodenale* mediante la amplificación de un fragmento del gen ITS-1. Esta técnica mostró un límite de detección de hasta 10pg de ADN por muestra [18].



En el 2001 Zhan B. y colaboradores diseñaron un ensayo que amplificaba un fragmento de 500pb del gen *cox1* dentro del mtDNA para identificar entre *N. americanus* y *A. duodenale*, esta técnica fue además probada exitosamente en cultivos en estadios de huevos, larvas y parásitos adultos de estas Ucinarias [19].

#### *PCR-Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica*

Hawdon en 1996 desarrolló un ensayo utilizando como diana un fragmento del gen *cAMP*, logrando establecer patrones característicos para la identificación de *N. americanus* y *A. duodenale* durante ensayos preliminares. A pesar de la elevada sensibilidad que presentó esta técnica, presentó una amplificación poco específica, encontrándose reacciones positivas para otros parásitos dentro de las Ucinariasis tanto animales como humanas [20]. Años más tarde Demeler y colaboradores desarrollaron un ensayo sobre el gen ITS-2 para establecer la presencia de *N. Americanus* y *Ancylostoma spp.* en muestras fecales. Con este objetivo se amplificó el gen completo usando un juego de cebadores comunes en todo el orden *strongiloidae* para posteriormente realizar una digestión enzimática para confirmar la especie. Los resultados permitían una identificación clara de la presencia de *N. Americanus* y *Ancylostoma spp.* con un 100% de sensibilidad al aplicar este protocolo sobre controles [21].

#### *PCR – Anidada*

Bajo esta modalidad se ha analizado extensivamente el gen ITS-2 del ADN ribosomal debido a su alta variabilidad inter-especie y baja variabilidad intra-especie, lo cual lo hace un candidato óptimo para establecer identificaciones a nivel de especie y estudios filogenéticos [22]. Estudios basados en este gen se han desarrollado ampliamente para identificar muestras de la región del norte de Togo y Ghana logrando establecer una amplia presencia de *N. americanus*, que incluso alcanzó una prevalencia del 50% en algunas aldeas [23]–[25]. Este gen también ha sido evaluado para establecer diagnósticos diferenciales entre *N. americanus* y *A. duodenale* en muestras de heces humanas en muestras procedentes de Bolgatanga y Garu al norte de Ghana detectando una prevalencia estimada para *A. duodenale* del 19.6%, y del 73.5% para *N. americanus* dentro de las cuales 16.9% correspondían a coinfecciones [26]. Utilizando esta misma metodología en muestras procedentes de ocho aldeas del oeste de Malasia se encontró un 76.6% de muestras positivas para *N. americanus*, un 12,8% de muestras



positivas para *A. ceylanicum* (especie identificada por secuenciación), un 10,6% de coinfecciones y ausencia de *A. duodenale*. Sin embargo solo el 81% (47 de 58) de las muestras identificadas como positivas mediante microscopía pudieron ser confirmadas por métodos moleculares, El autor presume que esto puede deberse a inhibidores presentes durante la PCR o a identificaciones erróneas durante la microscopía. [27].

#### *HRM - Curvas de disociación de alta resolución*

Mediante el uso de esta tecnología se han desarrollado dos trabajos, ambos usando al gen ITS-2 como diana, para realizar la detección de Uncinarias. El ensayo de Ngui en el 2012 permitió la identificación de *N. americanus*, *A. duodenale*, *A. ceylanicum*, *A. caninum* y *A. brasilense*. Mediante el análisis de controles se logró establecer una elevada sensibilidad y especificidad de esta técnica, misma que permitió incluso la identificación de infecciones múltiples [9]. Demeler y colaboradores desarrollaron un protocolo basado en el mismo gen, logrando resultados satisfactorios para la identificación de *N. americanus* y *Ancylostoma spp.* Todas las muestras evaluadas correspondieron a controles positivos donde solo una muestra positiva para *N. americanus* presentó una curva de denaturación con una ligera desviación hacia una temperatura mayor pero manteniendo su misma forma, este particular para los autores no consistió en un motivo para desestimar la técnica a pesar que no se ofrece una explicación a este evento [21].

#### *PCR – Tiempo real*

Esta variación de la técnica para amplificación de material genético por reacción en cadena de la polimerasa es sin duda la más difundida para el diagnóstico de Uncinarias. Todos los ensayos desarrollados para esta tecnología se han centrado en la detección del gen ITS-2. En el 2007 Verweij fue el primero en desarrollar cebadores para la detección de *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Oesophagostomum bifurcum* mediante PCR-Tiempo Real. Esta técnica altamente sensible mostró una fuerte correlación entre carga parasitaria por Kato-Katz y el valor de límite de ciclo de cada muestra. Además fue utilizada para el análisis de muestras de heces provenientes del norte de Ghana, de donde se estableció una prevalencia del 88.5% de muestras positivas para *N. americanus*, 6.8% de muestras positivas para *A. duodenale* y 30.4% para *O. bifurcum*, dentro de estos resultados el 6.2% correspondió a co-infecciones de *N. americanus* y *A. duodenale* y un 29.8% a co-infecciones entre



*N. americanus* y *O. bifurcum* [28]. Posteriormente otros autores usaron estos mismos cebadores para sus estudios, entre ellos destaca Basuni y colaboradores quienes en el 2011 desarrolló una PCR Multiplex en Tiempo real para la detección de cuatro parásitos más un control negativo (*A. Lumbricoides*, *S. Stercolaris*, *A. duodenale*, *N. americanus* y Herpes-virus porcino respectivamente). Esta aplicación mostró ser altamente específica y sensible, y posteriormente fue aplicada en el procesamiento de 225 muestras fecales procedentes del Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM), la estimación obtenida fue del 15.1% de muestras positivas para Uncinarias (*N. Americanus* y *A. duodenale* con el 8.9% y 6.2% respectivamente) siendo esta la parasitosis más común detectada según este estudio. La técnica permitió un incremento de 6.6 veces más en la detección de helmintos en relación a estudios microscópicos [8], [29].

Jonker y colaboradores en el 2012 utilizando los mismos cebadores desarrollados por Verweij en el 2007 lograron establecer la prevalencia de *N. americanus* y *A. duodenale* en niños de 6 a 60 meses desde el 2002 hasta el 2004 en regiones urbanas y rurales del Sur de Malawi. En donde el 26.1% y el 4.9% de las muestras fueron positivas para *A. duodenale* y *N. americanus* respectivamente. [30]. Mejía y colaboradores mediante estas mismas secuencias procesaron 400 muestras de heces de niños de 13 meses de edad y 125 muestras de niños de entre 8 a 14 años. La población estudiada correspondió al distrito de Quinindé, provincia de Esmeraldas en Ecuador, únicamente dos niños de 13 meses de edad resultaron positivos para *A. duodenale* [31]. Estos mismos cebadores fueron utilizados también por van Mens y colaboradores en el 2013 en muestras de heces de niños procedentes de zonas rurales y urbanas del Sur de Ghana en edad escolar. Se confirmó por biología molecular el 96% de los casos diagnosticados previamente por microscopía para la presencia de *N. Americanus*, adicionalmente se pudieron detectar 20 casos positivos para este nematodo en muestras que habían sido descartadas por microscopía. No se reportó ningún caso de *A. duodenale* [32].

En el 2012 Wang y colaboradores desarrollaron basados en el mismo gen, un ensayo para PCR-Tiempo Real para evaluar exclusivamente *N. americanus* a partir de muestras de heces humanas. Mediante esta técnica se logró detectar una prevalencia de 22.69% de positivos contra el 13.89% de positivos mediante Kato-Katz y el 16.2% de positivos conseguido mediante PCR convencional usando el mismo juego de cebadores. Destacando así la alta sensibilidad de la técnica [33].



### **Ascariasis:** *Ascaris lumbricoides*

Ascariasis es la helmintiasis intestinal más frecuente en el mundo, aproximadamente 1,4 billones de personas están infectadas, sobre todo en África, Latinoamérica y zonas de Asia[34]. En Ecuador hasta el 63% de personas estarían infestadas especialmente en áreas tropicales y rurales según un estudio realizado por Cooper y colaboradores en el 2003 en escuelas rurales de las provincias de Pichincha y Esmeraldas [35]. La distribución del parásito está ampliamente diseminada en áreas tropicales donde las personas acostumbran defecar a ras del suelo, los huevos depositados con las heces maduran a su forma infectante bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas. Los huevos al ser ingeridos por el hombre ingresan al tubo digestivo donde se produce su eclosión a larvas que atraviesan la mucosa intestinal, alcanza la circulación y posteriormente llegan a los pulmones, y desde ahí invaden los alveolos pulmonares pasando a los bronquios. Mediante la tos y la deglución reaparecen en el intestino delgado transformados en adultos, tiempo durante el cual dan lugar a la excreción de huevos en heces, iniciando el ciclo nuevamente.

#### *PCR-Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica.*

*Ascaris suum* y *Ascaris lumbricoides*, constituyen dos especies diferentes, pero estrechamente relacionadas. Zhu y colaboradores (1998), caracterizaron *Ascaris lumbricoides* de muestras colectadas en fase adulta de pacientes humanos tratados con antihelmínticos, y *Ascaris suum* de porcinos sacrificados. La secuencia ITS-1 de la región ribosomal (rDNA) fue amplificada mediante la técnica PCR-Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP). Los productos de la amplificación fueron digeridos con *HaeIII* para muestras de pacientes humanos, obteniendo patrones de restricción específicos que permitieron una diferenciación de estos parásitos [36], [37].

#### *PCR-Tiempo Real*

En el año 2011 se reporta el primer trabajo de aplicación de PCR–tiempo real para el diagnóstico de *A. lumbricoides* en muestras biológicas. Basuni y colaboradores diseñaron una pentaplex PCR en tiempo real para el diagnóstico de cuatro parásitos entre los que se incluyó a *Ascaris lumbricoides*. La amplificación de un fragmento del gen ITS1 de éste parásito reportó una mayor sensibilidad que la hallada por métodos de parasitología convencional, un año más tarde se aplicó el mismo protocolo para el diagnóstico de pacientes que acudieron al Hospital Universiti Sains Maylasia con síntomas de



desórdenes gastrointestinales. Dentro de los resultados reportados por biología molecular para *A. lumbricoides*, se identificaron como positivas a 2 muestras más de las 5 diagnosticadas por métodos convencionales demostrando una mayor sensibilidad para este método molecular [8], [29].

#### *Luminex*

Taniuchi y colaboradores en el 2011, utilizando el gen ITS1 desarrollaron una técnica de detección mediante tecnología PCR – tiempo real Luminex, el protocolo obtenido mostró una alta sensibilidad y especificidad. Al contrastar los resultados obtenidos por luminex contra PCR - tiempo real, se confirmaron 20 muestras positivas y 71 negativas para este parásito. El autor concluye que este método puede constituir una alternativa eficiente para diagnósticos clínicos sobre todo en laboratorios que no dispongan de un equipo de PCR - tiempo real [5].

#### **Estrongiloidiasis - *Strongyloides stercoralis***

La estrongiloidiasis es causada por el nematodo *Strongyloides stercoralis*, geohelminto generalmente localizado en el intestino delgado del ser humano. Una gran proporción de las infecciones permanecen asintomáticas, pero existe una morbi-mortalidad importante relacionada con esta parasitosis en pacientes inmunocomprometidos, donde el parásito se disemina a otros órganos gracias a su capacidad de autoinfección no controlada, produciendo fallas letales en más del 85% de los casos [38]. Representa una enfermedad endémica en áreas tropicales y subtropicales del mundo que incluyen a Europa, América y Sureste de Asia. Se estima que de 30 a 100 millones de personas en el mundo se encuentren infectadas con este parásito [39], sin embargo la verdadera prevalencia esta aun en duda debido a la falta de herramientas de diagnóstico estandarizadas [40].

Partenogénicamente *Strongyloides* tiene dos ciclos de vida, el ciclo de vida libre y el ciclo de vida parasitario. La larva filariforme que se encuentra en el suelo cumpliendo de ciclo de vida libre infecta al humano atravesando la piel por penetración, ingresando a la circulación sanguínea e iniciando el ciclo parasitario. En casos de autoinfección, *S. stercoralis* es capaz de madurar al estado filariforme infectivo, en el lumen intestinal, penetrar la mucosa intestinal y causar una infección crónica que puede llegar a sistemas cutáneos, gastrointestinales y pulmonares del paciente dependiendo de la respuesta inmunitaria del mismo.



En la mayoría de países en vías de desarrollo el método de diagnóstico de *S. stercoralis* consiste en la observación por microscopía de larvas del parásito [41], [42]. Sin embargo está limitada por la carga larvaria y la experticia del observador lo cual compromete la estimación real de la prevalencia [40], [43], [44]. Métodos de diagnóstico que utilizan herramientas inmunológicas como el inmuno-ensayo enzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFA) y Western Blot también se han reportado con una sensibilidad y especificidad variable dependiente del antígeno y protocolos utilizados [40], [45]. Mientras que ensayos de biología molecular muestran una mayor fiabilidad en el diagnóstico *S. stercoralis*, según reportan algunos estudios realizados [45], [46].

#### *PCR - Reacción En Cadena De La Polimerasa*

Mediante esta tecnología se han realizado dos trabajos de identificación, Moghaddassani y colaboradores en el 2011 analizaron los genes rDNA, mientras que Repetto y colaboradores en el 2013 estudiaron el gen 18S RNA. Los resultados alcanzados comprueban la alta sensibilidad de los métodos moleculares contra la de los métodos de detección tradicionales, permitiendo identificar muestras que habían sido reportados como negativos bajo cultivo en agar [47], [48].

#### *PCR-Anidada*

Nilforoushan y colaboradores en el año 2007 diseñaron un ensayo de detección mediante esta tecnología analizando un fragmento del gen ITS-1. Esta técnica fue inicialmente probada en controles usando la secuenciación de cada amplicón para confirmar la especificidad de la técnica [46]. En el 2008 Kía y colaboradores usaron este protocolo para la identificación de larvas obtenidas a partir de coprocultivos de un paciente con diagnóstico de leucemia linfocítica crónica. Mediante esta técnica de biología molecular fue posible confirmar el diagnóstico de *S. stercoralis* [49].

En el año 2013, Ahmad y colaboradores realizaron un estudio comparativo en una comunidad altamente endémica de Malasia en muestras de 54 individuos, contrastaron el protocolo utilizado por Nilforoushan y colaboradores (2007) contra el análisis microscópico y ELISA. El análisis inmunológico de las muestras detectó 17 positivas en contraste con el método de microscopía para el que todas las muestras fueron negativas a la presencia del parásito. Sin embargo, al procesar las muestras por biología molecular solo 3 de las 17 muestras identificadas como positivas mediante ELISA pudieron ser confirmadas, estos resultados son atribuidos a una baja carga parasitaria y a reacciones cruzadas del



inmuno-ensayo usado en esta investigación. El autor sugiere el uso de técnicas moleculares para la estimación de prevalencias y diagnóstico pero no descarta la aplicación de microscopia con muestras seriadas y ELISA para la evaluación de la efectividad de antiparasitarios [40].

El protocolo desarrollado por Nilforoushan y colaboradores, 2007 había sido convertido en un referente para el diagnóstico de *S. stercoralis* por PCR-Anidada, sin embargo, Moghaddassani y colaboradores en el 2011 demostraron que el protocolo de PCR convencional desarrollado en su estudio resultó ser tan específico, pero mucho más sensible que el de Nilforoushan. Se analizaron 782 muestras de heces de las cuales 16 fueron diagnosticadas por el protocolo de PCR convencional, pero solo 12 por el protocolo de Nilforoushan. Este desempeño se atribuye al reducido tamaño del amplicón de la PCR convencional que le permite una mayor eficiencia para amplificar sin comprometer la especificidad del diagnóstico [47].

#### *PCR-Tiempo Real*

Verweij y colaboradores en el 2009 desarrollaron el primer ensayo usando PCR- Tiempo Real para la detección de *S. stercoralis*. Encontraron que al utilizar un fragmento del gen 18S rRNA se obtenía una sensibilidad de 10 a 100 veces mayor que la obtenida al usar un fragmento del gen Citocromo C Oxidasa subunidad I o al evaluar una secuencia repetitiva específica de *S. stercoralis*. Al evaluar esta técnica contra métodos tradicionales de identificación como Baermann y coprocultivo, se estableció que posee una especificidad del 100% y una alta sensibilidad. A pesar de la alta sensibilidad encontrada, ésta técnica presentó un falso negativo en una muestra confirmada por duplicado por Baermann y coprocultivo, el autor adujo este resultado a la pequeña cantidad de muestra utilizada para la extracción de ADN que es 40 veces más pequeña a la utilizada en los métodos tradicionales, esto sin descartar la posibilidad de una identificación errónea de la larva mediante microscopia [45]. Hove y colaboradores usaron esta metodología para diagnosticar 21 muestras para *S. stercoralis* de entre 2591 muestras de pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical de Bélgica con problemas gastrointestinales con historial de viajes a países tropicales [50]. Basuni y colaboradores en el 2009 usaron estos cebadores para desarrollar una pentaplex pasada en PCR-Tiempo Real. Demostraron que la sensibilidad de estos permite la identificación de hasta 10 copias del gen. Posteriormente utilizaron esta Pentaplex para la identificación de muestras de 225 pacientes con desordenes gastrointestinales generales pertenecientes



del Hospital Universidad de Sains Malaysia, encontrando una prevalencia de *S. stercoralis* de 2.2%, casos que fueron reportados como negativos mediante microscopía [8], [51]. Rayman y colaboradores usaron los cebadores de Verweij para procesar 115 muestras de heces de las cuales 16 fueron reportadas como positivas por Baerman, 18 por Cultivo en Agar Plato, 11 por cultivo en agar Harada-Mory y 13 por Concentración mediante Formalin Etilacetato. Mediante PCR- Tiempo Real se logró confirmar las 23 muestras como positivas, incluyendo a 18 muestras que habían sido identificadas exitosamente por métodos tradicionales estableciendo con esto una elevada sensibilidad y especificidad del 94.8% gracias al uso de la sonda altamente específica usada en el ensayo [52].

En el 2013 Schära y colaboradores aplicaron esta misma técnica en 218 muestras de escolares asintomáticos de una región de Cambodia logrando establecer una prevalencia de 17.4% para *S. stercoralis*, con una sensibilidad y especificidad del 61% y 92,7% respectivamente obtenida mediante contraste con métodos tradicionales (Baermann, Koga Agar y Kato-katz). [53]. Mejía en el mismo año condujo un estudio incluyendo 400 muestras fecales procedentes de niños de 13 meses de edad de una provincia de Ecuador encontrando una prevalencia de 0,75% para *S. stercoralis*, estas 3 muestras identificadas por PCR-Tiempo Real fueron negativas durante el análisis microscópico, lo cual habla de la elevada sensibilidad de la técnica [31].

Por otro lado, Sultana y colaboradores en el año 2013 conduce un estudio para evaluar la sensibilidad del método descrito por Verweij y colaboradores (2009) contra el análisis de muestras cultivadas en medio Harada-Mori. Son analizadas 160 muestras de personas provenientes de Bangladesh. Una vez clasificadas las muestras de acuerdo a su carga parasitaria según el cultivo en medio Harada-Mori, se confirman el 100% de las muestras con carga parasitaria alta, pero solo el 15% de las muestras con carga parasitaria baja son diagnosticadas. Este bajo rendimiento se aduce a las condiciones de almacenamiento de las muestras por tiempo prolongado (12 meses a -20°C), a pesar de esto el autor sugiere el uso de biología molecular para el diagnóstico clínico de *S. stercoralis* solo en personas con una carga larvaria de moderada a elevada, contrastando a todos los análisis realizados anteriormente sobre la identificación molecular de este parásito [8], [31], [45], [51], [52], [54].

*HRM - Curvas de disociación de alta resolución*



Janwan, 2011 desarrollo un método de diagnóstico utilizando una PCR duplex en tiempo real HRM de *Strongyloides stercoralis* en muestras fecales, los cebadores usaban como diana a un fragmento del gen 18S rRNA. Tras este análisis se logró establecer que el límite de detección de este método fue de cuatro larvas de *S. stercoralis* en 100 mg de muestra fecal, esta técnica fue capaz de detectar infecciones en muestras de heces negativas por otros métodos y al mismo tiempo no mostró resultados cruzados en muestras con otros parásitos. [55]

#### LUMINEX

Taniuchi y colaboradores desarrollaron una aplicación alternativa de diagnóstico molecular basada en tecnología Luminex. Este ensayo se desarrolló usando los mismos cebadores desarrollados por Verweij y colaboradores en el 2009, variando únicamente la sonda usada en el ensayo de PCR-Tiempo Real con una sonda diseñada para tecnología Luminex. Se analizaron 91 muestras para la identificación de *S. stercoralis* contrastando el método original de Verweij (2009) con el desarrollado en esta investigación, 18 muestras se reportaron como positivas por el método Luminex de las cuales 16 habían sido previamente identificadas por PCR-Tiempo Real alcanzando una sensibilidad promedio del 95% y una especificidad promedio del 96% [5].

#### **Angiostrongiloidiasis:** *Angiostrongylus Cantonensis*

La Angiostrongiloidiasis es una parasitosis que afecta fundamentalmente a roedores en donde el ser humano actúa como hospedero accidental al ingerir larvas en estadio infectante. La forma madura de *Angiostrongylus cantonensis* se aloja en las arterias pulmonares de los roedores, donde copulan y liberan huevos los cuales alcanzan los capilares pulmonares gracias al torrente circulatorio, una vez ahí eclosionan liberando larvas de primer estadio (L1), estas se abren paso para volver a ser deglutidas y posteriormente expulsadas al exterior para ser ingeridas por hospederos intermediarios que generalmente son moluscos, caracoles y babosas. Las larvas sufren dos transformaciones hasta convertirse en el tercer estadio, su forma infectante (L3). Posteriormente estos hospederos intermedios son ingeridos por hospederos definitivos en donde migran al encéfalo y sufren dos mudas alcanzando el estadio de adulto juvenil (L5) desde el cual regresan por el sistema venoso hacia llegar a las arterias pulmonares, volviendo a iniciar el ciclo.



El humano representa un hospedero accidental dentro del ciclo de vida de este parásito, infectándose al ingerir caracoles, vegetales crudos o mal cocidos que están contaminados con larvas infectantes (L3), en el cual una vez ingeridas atraviesan la pared intestinal alcanzando la circulación arterial, luego la circulación encefalomeníngea donde se establecen horas después de la infección [56], [57].

La infección con *Angiostrongylus cantonensis* en humanos se relaciona con la meningitis eosinofílica y el diagnóstico clínico tradicionalmente ha sido realizado mediante microscopía del líquido céfalo-raquídeo. Sin embargo, este método frecuentemente conlleva a la aparición de falsos negativos hasta en la mitad de los casos estudiados debido a la baja sensibilidad de los métodos tradicionales entre los cuales se encuentran los basados en microscopía e inmunológicos [58], [59]. Como alternativa, los métodos moleculares permiten la identificación del material genético de este parásito en muestras biológicas como evidencia de su presencia y puede emplearse para su detección en fluidos, tejidos y secreciones tanto de los hospederos intermediarios como de los definitivos [60]–[62].

#### *PCR - Reacción En Cadena De La Polimerasa*

Los métodos de PCR convencional se han utilizado frecuentemente como una alternativa a la búsqueda por observación directa del parásito en moluscos intermediarios con el fin de determinar la distribución del parásito en el ambiente, Qvarnstrom en el 2007 desarrolló una prueba que detecta *A. cantonensis* directamente de secreciones y tejido del molusco *Parmarion martensi*, una de las especies de caracol consideradas plagas en Hawaii por su amplia distribución y potencialidad para transmitir el parásito [63]. El método de detección utiliza como marcador un fragmento del gen 18s rRNA. Este protocolo permitió la identificación de hasta una larva (L3) de *A. cantonensis* por cada miligramo de tejido o por cada 0,3g de secreciones de caracol, sin embargo la región elegida demostró no ser específica para este parásito, pues se obtuvieron resultados cruzados con otros parásitos endémicos de la zona de muestreo [60]. Este se constituye en el único trabajo realizado a partir del gen 18s rRNA.

Al siguiente año Fontanilla y Wade desarrollaron un método de identificación de nematodos extraídos del molusco *Laevicaulis altae* usando como diana un fragmento del gen SSU rRNA del género *Ancylostoma*, cada amplicón generado fue secuenciado para poder establecer una clara identificación del parásito, logrando la diferenciación de *A. cantonensis*, *A. costarricensis* y *A. vasorum* en las muestras de tejido analizadas [61].



Hasta la fecha se habían reportado solo trabajos de identificación de este parásito en hospederos intermediarios como lo constituye *Laevicaulis altae* o *Parmarion martensi*, no fue sino hasta el 2013 en donde Eamsobhana y colaboradores desarrollaron un método de identificación de este parásito en líquido céfalo raquídeo de pacientes con meningitis eosinofílica, constituyéndose en la primera aplicación de PCR convencional para diagnóstico de *A. cantonensis* en humanos con esta metodología. El método propuesto se basó en la identificación de un fragmento del gen que codifica para una proteína nativa de 66 kDa propia de este parásito. Tras el procesamiento de 10 muestras positivas diagnosticadas por ELISA\ Inmunoblot se logró confirmar solo a 4 de estos casos por PCR. Estos resultados se atribuyen a una baja carga parasitaria en las muestras restantes [64].

#### *PCR-Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica*

En el 2003 Caldeira y colaboradores utilizaron esta tecnología para la diferenciación e identificación entre las especies *A. cantonensis*, *A. costarricensis* y *A. vasorum*, aspecto de gran relevancia para el diagnóstico y control de las enfermedades causadas por *Angiostrongylus spp.* Para este fin se produjeron amplificaciones de los genes COI e ITS2, los cuales fueron digeridos con las enzimas RsaI, HapII, AluI, HaeIII, DdeI y ClaI para obtener patrones característicos de cada una de las especies, solo las enzimas RsaI y ClaI permitieron obtener patrones de identificación específicos. Esta técnica fue efectiva independientemente del estadio del parásito (Caldeira et al., 2003).

#### *PCR – Tiempo Real*

En búsqueda de métodos más específicos y sensibles para la detección *A. cantonensis*, Qvarnstrom y colaboradores en el 2010 publicaron un método que utiliza PCR en tiempo real para amplificar una fracción del gen ITS1 a partir de tejido de molusco. Los análisis establecieron el límite de detección en una copia del gen por microlitro de muestra. Este protocolo mostró ser muy específico ya que no se obtuvieron resultados cruzados con otras parasitosis [65]. Siguiendo la misma línea de investigación Jarvi y colaboradores (2013) usaron esta metodología para su aplicación en una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), la misma que además de demostrar mayor sensibilidad que las técnicas de microscopía, permitió obtener datos cuantitativos de la infección. Sin embargo, esta elevada sensibilidad, según el autor, puede ser atribuida a que el análisis molecular a diferencia del microscópico identifica tanto a larvas vivas como a muertas y a la posible identificación errónea durante el conteo de



larvas en el método microscópico. Se destaca la importancia del método para la identificación del nivel de infección de hospederos intermediarios [66].

El último trabajo reportado por tecnología de PCR – tiempo real para identificación de este parásito fue el realizado por Fang y colaboradores (2012) quienes desarrollaron un método basado en la identificación de un fragmento del gen ITS2. Esta técnica fue utilizada para detectar material genético de larvas L1 de *A. cantonensis* en heces de hospedadores definitivos (*Rattus rattus*). El ensayo fue capaz de detectar hasta una larva L1 en un grano ( $320 \pm 125$  mg) de heces frescas de ratas Sprague-Dawley infectadas experimentalmente, identificando como positivas a muestras de heces conservadas a temperatura ambiente por 12 meses. A pesar de alcanzar un límite de detección mejor que el permitido por microscopía, se estableció que la secuencia elegida guarda similitud con otros parásitos dentro del género *Angiostrongylus* lo cual sugiere la presencia de falsos positivos [62].

#### *LAMP – Amplificación isotérmica mediada por lazo*

Chen y colaboradores en el 2011 desarrollaron un protocolo basado en tecnología LAMP para la detección de *A. cantonensis* mediante la detección de un fragmento del gen 18s rRNA. Esta técnica demostró una alta sensibilidad al lograr detectar la presencia de material genético de *A. cantonensis* en las muestras de hasta 0.01fg de ADN del parásito, contrastando al límite de detección que obtuvo tras la aplicación de PCR convencional 0.1ng, valor que también fue reportado por Qvarnstrom y colaboradores en el año 2010. Este análisis no presentó reacciones cruzadas con otras parasitosis gastrointestinales, demostrando ser una técnica sensible y específica para la detección de *A. cantonensis* en hospederos intermediarios [67].

#### *Inmuno-PCR*

La detección de infecciones causadas por *A. cantonensis* en humanos ha sido tradicionalmente realizada usando métodos serológicos, sin embargo, las reacciones cruzadas con otros parásitos y la baja sensibilidad de estos métodos han promovido el desarrollo de técnicas más sensibles como la inmuno-PCR. Aprovechando la especificidad del ELISA sándwich ideado por Chye y colaboradores (1997) se desarrolló un método que detecta la reacción antígeno-anticuerpo para larvas de *A. cantonensis* (L3) usando como marcador una secuencia de ADN que es amplificada mediante tecnología de PCR convencional cuando existe la infección.



El límite de detección de esta metodología fue de 0.1 ng/L de antígeno en suero, en contraste con el análisis de ELISA cuyo límite de detección fue de 10ng/L. De esta forma se confirmaron 59 de 60 muestras de pacientes que habían sido previamente diagnosticadas por ELISA, incluyendo 30 pacientes en los cuales el parásito había sido identificado en el líquido céfalo-raquídeo [58].

## CONCLUSIÓN

El uso de técnicas moleculares ha permitido el desarrollo de métodos de identificación con una elevada sensibilidad y especificidad. Por su fundamento, estos métodos no se ven limitados por factores que afectan a los métodos tradicionales, como son la cantidad de muestra disponible, la carga parasitaria y la experiencia del observador, mismas que condicionan el análisis de estas parasitosis en muestras biológicas.

Dentro de este compendio bibliográfico, los genes ITS1, ITS2 y 18 S RNA han sido los más reportados en la identificación de urcinarias, *Ascaris lumbricoides*, *Stongyloides stercoralis* y *Angiostrongylus cantonensis*, siendo la técnica de PCR en tiempo real la más utilizada debido a su relativo bajo costo y la fidelidad otorgada por sus resultados. La tabla disponible en los anexos registra los genes, las secuencias de cebadores y las técnicas utilizadas por cada autor.

Dada la variedad de métodos moleculares encontrados en esta revisión para la identificación de parasitosis, resultaría interesante la aplicación de una técnica establecida que permita identificar la prevalencia dentro de una misma población, remarcando el impacto clínico que estas parasitosis poseen sobre grupos humanos específicos.

Adicionalmente, parasitosis como la angiostrongiloidiasis presentan un reto para el diagnóstico molecular en humanos debido a la complejidad en la toma de muestras y la disponibilidad de las mismas cuando se procura diagnóstico temprano de dichas infecciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Gamboa MI, Kozubsky LE, Costas ME, Garranza M, Cardozo MI, Susevich ML, et al. Asociación entre geohelminthiasis y condiciones socioambientales en diferentes poblaciones humanas de Argentina Rev Panam Salud Pública. 2009;26(1):1-8.
- [2] Ananthakrishnan S, Nalini P, Pani SP. Intestinal geohelminthiasis in the developing world. Natl. Med. J. India. 1997;10(2):62-71.



- [3] Organización Mundial de la Salud. OMS | Helminthiasis transmitidas por el suelo. 2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/index.html>.
- [4] Gordon CA, Gray DJ, Gobert GN, McManus DP. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. *Mol. Cell. Probes.* 2011;25(4):143–152.
- [5] Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Van Lieshout L, Petri WA, Haque R, Houpt ER. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;84(2):332-7.
- [6] Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F, Hänni C. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol.* 2001;31(10):1101-6
- [7] L'Ollivier C, Piarroux R. Diagnosis of human nematode infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(12):1363-76
- [8] M Basuni M, Muhi J, Othman J, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):338-43.
- [9] Ngui R, Lim YL, Chua KH. Rapid detection and identification of human hookworm infections through high resolution melting (HRM) analysis. *PLoS One.* 2012;7(7):41996.
- [10] C. Stensvold CR, Nielsen HV. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):540-1.
- [11] de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 2003;19(12):547-51.
- [12] Diemert DJ, Bethony JM, Hotez PJ. Hookworm vaccines. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):282-8.
- [13] Hotez P. Hookworm and poverty. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1136:38-44.
- [14] Stoltzfus RJ. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Summary: implications for research and programs. *J Nutr.* 2001;131(2S-2):697S-700S; discussion 700S-701S.



- [15] Hotez PJ, Pritchard DI. Hookworm infection. *Sci Am*. 1995;272(6):68-74.
- [16] Jia T-W, Melville S, Utzinger J, King CH, Zhou X-N. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1621.
- [17] Glinz D, Silué KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, et al. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e754.
- [18] Monti JR, Chilton NB, Qian BZ, Gasser RB. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Mol Cell Probes*. 1998;12(2):71-8.
- [19] Zhan B, Li T, Xiao S, Zheng F, Hawdon JM. Species-specific identification of human hookworms by PCR of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. *J Parasitol*. 2001;87(5):1227-9.
- [20] Hawdon JM. Differentiation between the human hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* using PCR-RFLP. *J Parasitol*. 1996;82(4):642-7.
- [21] Demeler J, Ramünke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu JB, et al. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS One*. 2013;8(4):e61285.
- [22] Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(10):2525-6.
- [23] Verweij JJ, Pit DS, Van Lieshout L, Baeta SM, Dery GD, Gasser RB, Polderman AM. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Trop Med Int Health*. 2001;6(9):726-31.
- [24] Romstad A, Gasser RB, Monti JR, Polderman AM, Nansen P, Pit DS, Chilton NB. Differentiation of *Oesophagostomum bifurcum* from *Necator americanus* by PCR using genetic markers in spacer ribosomal DNA. *Mol Cell Probes*. 1997;11(3):169-76.



- [25] Verweij JJ, Polderman AM, Wimmenhove MC, Gasser RB. PCR assay for the specific amplification of *Oesophagostomum bifurcum* DNA from human faeces. *Int J Parasitol.* 2000;30(2):137-42.
- [26] de Gruijter JM, van Lieshout L, Gasser RB, Verweij JJ, Brienen EA, Ziem JB, Yelifari L, Polderman AM. Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in humans in northern Ghana. *Trop Med Int Health.* 2005;10(6):574-80.
- [27] Ngui R, Lim YL, Traub R, Mahmud R, Mistam MS. Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1522.
- [28] M. Basuni, Z. Mohamed, and M. Ahmad, "Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR.," *Trop Biomed*, vol. 29, no. 3, pp. 434–42, Sep. 2012.
- [29] Basuni M, Mohamed Z, Ahmad M. Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. *Trop Biomed.* 2012;29(3):434-42.
- [30] Jonker FA, Calis JC, Phiri K, Brienen EA, Khoffi H, Brabin BJ, Verweij JJ, van Hensbroek MB, van Lieshout L. Real-time PCR demonstrates *Ancylostoma duodenale* is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(3):e1555.
- [31] Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper PJ, Nutman TB. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1041-7.
- [32] Van Mens SP, Aryeetey Y, Yazdanbakhsh M, van Lieshout L, Boakye D, Verweij JJ. Comparison of real-time PCR and Kato smear microscopy for the detection of hookworm infections in three consecutive faecal samples from schoolchildren in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(4):269-71.



- [33] Wang J-X, Pan C-S, Cui L-W, Chen X. Application of a real-time PCR method for detecting and monitoring hookworm *Necator americanus* infections in Southern China. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2(12):925-9.
- [34] Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *PLoS Med.* 2008;118(4):1311-21.
- [35] Cooper PJ, Chico ME, Bland M, Griffin GE, Nutman TB. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(3):313-7.
- [36] Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Sørensen UBS, Roepstorff A. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1064-6.
- [37] Zhu X, Chilton NB, Jacobs DE, Boes J, Gasser RB. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol.* 1999;29(3):469-78.
- [38] Montes M, Sawhney C, Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *NIH Public Access.* 2011;23(5):500-4.
- [39] Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 2006;367(9521):1521-32.
- [40] Ahmad AF, Hadip F, Ngui R, Lim YAL, Mahmud R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. *Parasitol Res.* 2013;112(8):2811-6.
- [41] Nontasut P, Muennoo C, Sa-nguankiat S, Fongsri S, Vichit A. Prevalence of *Strongyloides* in Northern Thailand and treatment with ivermectin vs albendazole. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36(2):442-4.
- [42] Devi U, Borkakoty B, Mahanta J. *Strongyloidiasis* in Assam, India: A community-based study. *Trop Parasitol.* 2011;1(1):30-2.
- [43] Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. *Strongyloidiasis*—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(10):967-72.



- [44] Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli A-F, Levecke B, Socias E, et al. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):2165.
- [45] Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EA, Polderman AM, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):342-6.
- [46] Nilforoushan M, Mirhendi H, Rezaie S, Rezaian M, Meamar AR, Kia EB. A DNA-Based Identification of *Strongyloides stercoralis* Isolates from Iran. 2007;36(3):16-20.
- [47] Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni M, Mowlavi G, Kia E. Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples. *Iran J Parasitol*. 2011;6(2):23-30.
- [48] Repetto SA, Alba Soto CD, Cazorla SI, Tayeldin ML, Cuello S, Lasala MB, et al. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Trop*. 2013;126(2):110-4.
- [49] Kia EB, Rahimi HR, Mirhendi H, Nilforoushan MR, Talebi A, Zahabiun F, et al. A case of fatal strongyloidiasis in a patient with chronic lymphocytic leukemia and molecular characterization of the isolate. *Korean J Parasitol*. 2008;46(4):261-3.
- [50] Ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(9):1045-53.
- [51] Basuni M, Mohamed Z, Ahmad M, Zakaria NZ, Noordin R. Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. *Trop Biomed*. 2012;29(3):434-42.
- [52] Rayan H, Soliman R, Galal N. Detection of *Strongyloides stercoralis* in fecal samples using conventional parasitological techniques and real-time PCR: A comparative study. *J. Egyptian Parasitol. United*. 2012;5(1):27-34.



- [53] Schära F, Odermatta P, Khieua V, Panninge M, Duong S, Muthc S, Martib H, Krammeb S. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Trop.* 2013;126:89-92.
- [54] Sultana Y, Jeoffreys N, Watts MR, Gilbert GL, Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;88(6):1048-51.
- [55] Janwan P, Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Anamnart W, Maleewong W. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* and *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples using a duplex real-time PCR and melting curve analysis. *Parasitol. Res.* 2011;109(6):1593-601.
- [56] Prociv P, Spratt DM, Carlisle MS. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. *Int. J. Parasitol.* 2000;30(12-13):1295-303.
- [57] Muzzio J. Moluscos hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en dos provincias de Ecuador. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”; 2011.
- [58] Chye S-M, Lin S-R, Chen Y-L, Chung L-Y, Yen C-M. Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms. *Clin. Chem.* 2004;50(1):51-7.
- [59] Savioli L. El Control de las enfermedades transmisibles. Décimotav. Washington: OPS, OMS; 2005. p. 7-9.
- [60] Qvarnstrom Y, Sullivan JJ, Bishop HS, Hollingsworth R, da Silva AJ. PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(5):1415-9.
- [61] Fontanilla IKC, Wade CM. The small subunit (SSU) ribosomal (r) RNA gene as a genetic marker for identifying infective 3rd juvenile stage *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop.* 2008;105(2):181-6.
- [62] Fang W, Wang J, Liu J, Xu C, Cai W, Luo D. PCR assay for the cell-free copro-DNA detection of *Angiostrongylus cantonensis* in rat faeces. *Vet. Parasitol.* 2012;183(3-4):299-304.
- [63] Hollingsworth RG, Kaneta R, Sullivan JJ, Bishop HS, Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Robinson DG. Distribution of *Parmarion cf. martensi* (Pulmonata: Helicarionidae), a new semi-slug pest on Hawai'i Island, and its potential as a vector. *Pacific Sci.* 2007.



- [64] Eamsobhana P, Wanachiwanawin D, Dechkum N, Parsartvit A, Sen Yong H. Molecular diagnosis of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) by polymerase chain reaction-DNA sequencing of cerebrospinal fluids of patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):116-8.
- [65] Qvarnstrom Y, da Silva ACA, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C, da Silva AJ. Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer 1-based TaqMan assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(15):5287-9.
- [66] Jarvi S, Fariasa M, Howe K, Jacquiera S, Hollingsworth R, Pitt W. NIH Public Access. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2013;185(2):174-6.
- [67] Chen R, Tong Q, Zhang Y, Lou D, Kong Q, Lv S, Zhuo M, Wen L, Lu S. Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasit. Vectors.* 2011;4(1):204.
- [68] Monti JR, Chilton NB, Qian BZ, Gasser RB. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Mol. Cell. Probes.* 1998;12(2):71-8.
- [69] Carlsgart J, Roepstorff A, Nejsum P. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitol. Res.* 2009;104(4):939-43.
- [70] Leles D, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP, Iñiguez AM. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):106-8.
- [71] Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens. CRC Press; 2012. p. 895.
- [72] Cavallero S, Snabel V, Pacella F, Perrone V, D'Amelio S. Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jan;7(4):e2170.
- [73] Anderson TJ. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology.* 1995 Feb;110(Pt 2):215-9.



- [74] Pecson BM, Barrios JA, Johnson DR, Nelson KL. A real-time PCR method for quantifying viable *Ascaris* eggs using the first internally transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec;72(12):7864-72.
- [75] Rayan HZH, Soliman RRH, Galal NMN. Detection of *Strongyloides stercoralis* in fecal samples using conventional parasitological techniques and real-time PCR: a comparative study. 2012;5(1):27-34.
- [76] Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CL, Graeff-Teixeira C, Silva MC, Ben R, Maurer R, Lima WS, Lenzi HL. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003 Dec;98(8):1039-43.



Nombre del parásito	Ensayo de PCR	Gen blanco	Producto de amplificación (pb)	Primers	Secuencia (5' - 3')	
<i>Ancylostoma duodenale</i>	PCR convencional	CO I	585 pb	COF14 COR722	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAY	
			500 pb	AdF AdR	TTC G TT TGG AGT TGG CA TGG CAC CAG CCA ATA CA	
	PCR convencional	28S rRNA	870 pb	NC5	GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC	
			366 pb	NC2 NC1R	TT TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT (reverse) AAC AAC CCT GAA CCA GAC GT (reverse)	
	Nested PCR (Anidada)	ITS2 (rADN)	130 pb	NC1 NC2	ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT TTAG TTT CTT TTC CTC CGCT	
			180-200 pb	AD1 UMF UMR	CGAC TTT AGA ACG TTT CGG C (forward) CAC TGT TTG TCG AAC GGY AC AGT CSV KRR RCG ATT MAR CAG	
	Análisis de Resolución de Denaturación	Alta de	ITS2	71 pb	Ad125F Ad195R Ad155MGB	GAA TGA CAG CAA ACT CGT TGT TG ATA CTA GCC ACTG CCG AAA CGT NED-5_-ATC GTT TAC CGA CTT TAG-3 nonfluorescent quencher
	PCR convencional	CO I	585 pb	COF14 COR722	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAY	
			PCR convencional	28S rRNA	500 pb	NaF NaR
Nested PCR (Anidada)	ITS2 (rADN)	1100 pb			NC5 NC2	GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC TT
		Análisis de Resolución de Denaturación	Alta de	ITS2	526 pb	NC1R
Multiplex tiempo real MGB-Taqman	ITS2				250 pb	NC1 NC2 AD1
		Análisis de Resolución de Denaturación	Alta de	ITS2	180-200 pb	UMF UMR
Multiplex tiempo real MGB-Taqman	ITS2				101 pb	Na 58F NA158R Na81MGB
		Luminex	ITS2	101 pb	Na58F * Na158R Na81P	CTG TTT GTC GAA CGG TAC TTG C ATA ACA GCG TGC ACA TGT TGC CTG TAC TAC GCA TTG TAT AC
PCR convencional	ITS1 rDNA			504 pb	AsITS1F ASITS1R	CTT GAA CCG GGT AAA AGT CG ATG TGC TGC AAT TCG CAC T
		PCR convencional	cytochrome b mtDNA	142 pb	AsC1F AsC2R	GTT AGG TTA CCG TCT AGT AAG G CAC TCA AAA AGG CCA AAG CAC C
PCR convencional	Citochrome oxidase I (cox I) mtDNA			400 pb	As-Co1F As-Co1r	TTT TTT GGT CAT CCT GAG GTT TAT ACA TAA TGA AAA TGA CTA ACA AC
		PCR-RFLP	IT	370 pb	370 pb	TTG AAC CGG GTA AAA GTC GT TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT
610 pb	NC5 NC2			GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTA GTT TCT TCC TCC GCT		



<i>Strongyloides stercoralis</i>	PCR- tiempo real	ITS1		ALITS F (32-57) ALITS R (113-97) ALITS P (62-78)	TGC ACA TAA GTA CTA TTT GCG CGT A CCG CCG ACT GCT ATT ACA TCA GAG CCA CAT AGT AAA TT
			89 pb	Alum96F Alum183R Alum124T	GTA ATA GCA GTC GGC GGT TTC TT GCC CAA CAT GCC ACC TAT TC ROX-5'-TTG GCG GAC AAT TGC ATG CG T-3'-black hole quencher 2
	Luminex	ITS1	480 pb	Alum F* (96) Alum R (183) Alum P (124)	GTA ATA GCA GTC GGC GGT TTC TT GCC CAA CAT GCC ACC TAT TC TTG GCG GAC AAT TGC ATG CGA T
		rRNA gen	114 pb	SSF SSR	ATC GTG TCG GTG GAT CAT TC CTA TTA GCG CCA TTT GCA TTC
	PCR convencional	18S RNA gen	101 pb	Forward Reverse	GAA TTC CAA GTA AAC GTA AGT CA TAG C TGC CTC TGG ATA TTG CTC AGT TC
			149 pb	Forward Reverse	GAA GGC AGC AGG CGC GAA AA GCT GGC ACC AGA CTT GCC CTT T
		ITS-1, 5.8 S e ITS-2	750 pb	SSFO SSRO	ATC CTT CCA ATC GCT GTT GT TTT CGT GAT GGG CTA ATT CC
			680 pb	SSF1 SSR1	GTA ACA AGG TTT TCG TAG GTG AA ATT TAG TTT CTT TTC CTC CGC TT
	Nested (Anidada)	PCR ITS-1	750 pb	SS-FO SS-RO	ATC CTT CCA ATC GCT GTT GT TTT CGT GAT GGG CTA ATT CC
			680 pb	SS-F1 SS-R1	GTA ACA AGG TTT TCG TAG GTG A ATT TAG TTT CTT TTC CTC CGC TT
PCR- tiempo real	Citocromo C oxidasa subunidad I	121pb	StroCyt360F StroCyt480R StroCyt399-MGB	CAT CCT GGT TCT AGT GTT GAT TTG C GAG AAA CAG AAC TAG AAC GCA AA TT CAT CTT TCT GGT ATT AGT TCT AT	
	Secuencia repetitiva	96pb	Stro F Stro R Strongy	TCC AGA AAA GTC TTC ACT CTC CAG TGC GTT AGA ATT TAG ATA TTA TT TTG CT TCA GCT CCA GTT GAA CAA CAG CC CCA A	
	18S rRNA	101pb	Stro18S-1530F Stro18S-1630R Stro18S-1586T	GAA TTC CAA GTA AAC GTA AGT CA TAG C TGC CTC TGG ATA TTG CTC AGT TC ACA CAC CGG CCG TCG CTG C	
Luminex	18S RNA gen	101pb	Stro 18SF Stro18SR Stro18SP	GAA TTC CAA GTA AAC GTA AGT CA TAG C TGC CTC TGG ATA TTG CTC AGT TC ACA CAC CGG CCG TCG CTG C	
Angiostrongylus cantonensis	PCR Convencional	18s rRNA	1134pb	AngioF1 AngioR1	ATC ATA AAC CTT TTT TCG AGT AT CAG TCT CGA GAC AGC TCA GTC CCG G



	Proteína nativa	66 kDa	280pb	AC1 AC2	CTC GGC TTA ATC TTT GCG AC AAC GAG CGG CAG TAG AAA AA GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG
	COI		700 pb	LCO HCO	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AA CA
PC-RRFLP	ITS2		650 pb	NC1 NC2	ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT
PCR- tiempo real	ITS1			AngioF1674 58SR4	GTC GTA ACA AGG TAT CTG TAG GTG TAG CTG CGT TTT TCA TCG ATA
	ITS1			AcanITS1F1 AcanITS1R1	TTC ATG GAT GGC GAA CTG ATA G GCG CCC ATT GAA ACA TTA TAC TT
LAMP	ITS2			F3 B3 FIP (F1C-F2) BIP (B1c-B2)	TTG TCG AGG AGC TTC CCG CAC CAA CTA AGA ACG GCC AT CCT GGT GGT GCC ATT CCG TCT CT TCG GTT CCT GGG GTA G GCC CGG ACA CCG TAA GGA TTG CA CAC CAA CCA CCA AAT
Inmuno-PCR	Antígeno ( AcL5 204 kDa) Gen (pUC19)		150 pb	Forward Reverse	GTT TTC CCA GTC ACG AC AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

