

Margarita Roka Elobo

# Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial

Departamento  
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud  
Pública

Director/es

Goñi Cepero, María Pilar  
Clavel Parrilla, Antonio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN DE PARÁSITOS  
INTESTINALES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR  
VIH EN GUINEA ECUATORIAL**

Autor

**Margarita Roka Elobo**

Director/es

Goñi Cepero, María Pilar  
Clavel Parrilla, Antonio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2012





Departamento de  
Microbiología, Medicina  
Preventiva y Salud Pública

Universidad Zaragoza

# Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por **VIH** en Guinea Ecuatorial

Memoria presentada por **Margarita Roka Elobo**

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por

Dra. M.<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero

Dr. Antonio Clavel Parrilla



**El Dr. Antonio Clavel Parrilla, Catedrático de Parasitología,  
del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y  
Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad de  
Zaragoza,**

**Certifica:**

Que el trabajo titulado “*Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial*”, que corresponde al proyecto de tesis de igual título aprobado el 9 de julio de 2012, realizado por Dña. Margarita Roka Elobo en el Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública bajo mi dirección, reúne a mi juicio méritos suficientes para poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que doy la oportuna autorización para su presentación.

Y para que conste, firmo el presente en Zaragoza a 29 de junio de 2012.

Fdo. Antonio Clavel Parrilla



**La Dra. M<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero, Profesora Ayudante-Doctor de Parasitología, del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza,**

**Certifica:**

Que el trabajo titulado “*Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial*”, que corresponde al proyecto de tesis de igual título aprobado el 9 de julio de 2012, realizado por Dña. Margarita Roka Elobo en el Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública bajo mi dirección, reúne a mi juicio méritos suficientes para poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que doy la oportuna autorización para su presentación.

Y para que conste, firmo el presente en Zaragoza a 29 de junio de 2012.

Fdo. M<sup>a</sup> Pilar Goñi Cepero



## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas a las que tengo que expresar mi más profundo agradecimiento, por la colaboración y la ayuda ofrecida para la culminación de este trabajo, el apoyo psicológico, la cercanía, la amistad, el cuidado diario y el cariño durante estos años de trabajo intenso.

A la Facultad de Ciencias de la Salud de Zaragoza, por haberme posibilitado incorporarme al mundo de la investigación y a la Universidad de Zaragoza, por brindarme la oportunidad de realizarla.

A mis tutores, D. Antonio Clavel y Dña. Pilar Goñi, por ofrecerme el laboratorio de parasitología, por el apoyo personal y profesional, sobre todo, por la paciencia que han tenido conmigo. Siempre os estaré agradecida.

A mis queridas “Chicas” del Área de Parasitología del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública que en todo momento me brindaron su cercanía y apoyo.

Al personal del Laboratorio de Análisis Clínicos Castroverde por haberme permitido iniciar y culminar esta investigación que, sin duda, será para el bien de nuestro pueblo. Ha sido duro para todos, pero tenemos que estar convencidos de que el logro es de todos.

Al Colegio Mayor Universitario Josefa Segovia de Zaragoza, especialmente en la persona de su directora, M<sup>a</sup> Pilar Caudevilla, por su acogida en el colegio. Su actitud y cuidados me han hecho sentirme en casa, en familia.

A mis padres, que me han esperado y animado con cariño y con generosidad inmensa. Sé que durante mi ausencia han vivido momentos de dolor; sin embargo, lo han llevado de la mejor manera posible. A mis hermanas y a mi Nene, y a toda mi familia. También es para vosotros este gran logro.

A Encarnación Ruíz, que su presencia en Malabo ha hecho posible mi presencia en Zaragoza. Igualmente es para ti este logro.

A los técnicos de los laboratorios de microbiología del Hospital General de Malabo, del Hospital Regional de Bata y del Centro de Salud María Rafols de Bata, por acogerme y

brindarme un espacio para la recogida de datos y muestras. En algunos hasta la realización de la primera observación microscópica de las muestras.

Al personal de la UREI de Malabo por facilitarme los informes y seguimiento de los pacientes, así como el derivarlos para el estudio.

A Raquel Bendje, por facilitarme la recogida de datos y de muestras en Bata, haciendo de traductora y de apoyo técnico.

A la empresa Guinea Cargo que, con su solidaridad, hicieron posible la llegada del material de trabajo a Bata.

A André que, con su alegría contagiosa, hacía fácil lo difícil a la hora de realizar todos los trámites para el envío de las muestras a España.

A la profesora Encarnación Rubio por su gran ayuda y aporte en el análisis estadístico de los datos.

A quienes, a título personal, han querido aportar su colaboración de diversa índole para que este proyecto haya podido salir adelante.

A la Institución Teresiana por la oportunidad que me ha brindado facilitándome la presencia en España y todo el apoyo necesario para hacer realidad el diálogo entre la “fe y la ciencia” a través de esta investigación.

A la OMS (oficina de Malabo) por el apoyo técnico y validación de mi proyecto de investigación.

A la AECID por haberme concedido la beca para la investigación. Al Proyecto FIS PI09/01585, BG limitada Ecuatorial Guinea y la Presidencia del Gobierno de Guinea Ecuatorial por su apoyo financiero. A Operón S.A. y a Durviz S.A. por la donación de los test de ICR y medios de conservación de las muestras SAF respectivamente.

Al Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial y sus autoridades, por haber apostado por mí, aprobando el estudio y poniendo a mi alcance todas las facilidades.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a las personas que viven con el VIH y a sus familias que libremente aceptaron participar en este proyecto de investigación.

A Erímola y a todas aquellas personas que de alguna manera han apoyado este trabajo y me animaron a seguir adelante, con tesón, en los momentos difíciles.

¡A todos muchas gracias!



A mis padres y a mi tierra, África.

*“Solamente dos legados duraderos podemos aspirar a dejar a nuestros hijos: uno, raíces; el otro, alas”* (Hodgins Carter)



***ABREVIATURAS***

---



## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARV:** Antirretrovirales.

**AZT:** Zidovudina.

**BLAST:** Basic local alignment search tool.

**BrEt:** Bromuro de etidio.

**CTA:** Centro de Tratamiento Ambulatorio.

**D4T:** Estavudina.

**DDI:** Didanosina.

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato.

**EFV:** Efavirenz.

**ELISA:** Ensayo inmunoenzimático.

**ESBA:** Enseñanza Secundaria Básica.

**FASTA:** Buscador de secuencias similares.

**FP:** Formación Profesional.

**IC:** Intervalo de confianza.

**ICR:** Inmunocromatografía rápida.

**IDH:** Indicadores de desarrollo humano.

**INC:** inmunocompetente.

**IO:** Infecciones oportunistas.

**ISA:** Inmunosupresión avanzada.

**ISM:** Inmunosupresión moderada.

**ISS:** Inmunosupresión severa.

**KDa:** Kilodaltons.

**LPV:** Lopinavir.

**Mg.:** Miligramos.

**MINSABS:** Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial.

**ml.:** Mililitros.

**mM:** Milimolar.

**NVP:** Nevirapina.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**pb:** pares de bases.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PTMH:** Prevención de la transmisión de la madre al hijo del VIH.

**PVVIH:** Persona que vive con el VIH.

**PVVS:** Persona que vive con el virus del SIDA.

**RFLP:** Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**S/V:** sin valor.

**SAF:** Formalina-ácido-acético-acetato de sodio.

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

**SNP:** Sustitución nucleotídica puntual.

**SSUrRNA:** Subunidad pequeña del ARN ribosomal.

**TARGA:** Tratamiento antirretroviral de gran actividad.

**TARV:** Tratamiento antirretroviral.

**TBE:** Tampón Tris-borato-EDTA.

**3TC:** Lamivudina.

*tpi:* Triosafosatoisomerasa.

**UREI:** Unidad de Referencia de las Enfermedades Infecciosas.

**µg:** Microgramos.

**µl:** Microlitros.

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.

**VPN:** Valor predictivo negativo.

**VPP:** Valor predictivo positivo.

**ZNm:** Ziehl-Neelsen modificado.

***INDICE DE CONTENIDO***

---



# ÍNDICE DE CONTENIDO

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 DATOS GEOGRÁFICOS E INDICADORES DE DESARROLLO HUMANO DE LA REPÚBLICA DE GUINEA ECUATORIAL .....	1
1.2 RELACIÓN VIH/SIDA E INFECCIONES PARASITARIAS INTESTINALES	6
1.2.1 Helmintos patógenos .....	7
1.2.1.1 <i>Trichuris trichiura</i> .....	8
1.2.1.2 <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	10
1.2.1.3 Uncinarias .....	11
1.2.1.4 <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	13
1.2.1.5 <i>Schistosoma</i> spp.....	14
1.2.2 Protozoos patógenos .....	16
1.2.2.1 <i>Entamoeba</i> spp. ....	16
1.2.2.2 <i>Giardia</i> spp. ....	19
1.2.2.3 <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	21

## CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 Objetivo general .....	32
2.2 Objetivos específicos .....	32

## CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	37
3.1 Pacientes y muestras .....	37
3.1.1 Muestreo y tamaño muestral.....	37
3.1.2 Recogida de la muestra y conservación.....	37
3.1.3 Definición de variables y recogida de datos .....	38
3.1.4 Muestras de la población objeto del estudio.....	44
3.2 Identificación de parásitos por observación microscópica .....	45

3.2.1 Técnica microscópica con suero fisiológico y lugol .....	45
3.2.2 Técnica de concentración de heces.....	46
3.2.3 Tinción ácido alcohol resistente de Ziehl-Neelsen modificado (ZNm) .....	47
3.3 Técnica de detección de antígenos por inmunocromatografía rápida (ICR) .....	48
3.4 Técnicas de biología molecular .....	49
3.4.1 Extracción de ADN .....	49
3.4.2 Técnicas moleculares para la detección de <i>Entamoeba</i> spp. ....	52
3.4.3 Técnicas moleculares para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	54
3.4.4 Técnicas moleculares para la detección y genotipado de <i>Giardia</i> spp.....	56
3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa .....	60
3.4.6 Purificación del DNA a partir de la segunda PCR .....	62
3.4.7 Secuenciación .....	63
3.5 Análisis estadísticos de los datos.....	64
3.6 Consideraciones éticas.....	65

## **CAPÍTULO 4: TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

<b>4. RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES .....</b>	<b>71</b>
4.1 Descripción de la muestra.....	71
4.1.1 Participantes VIH positivos .....	71
4.1.2 Participantes VIH negativos .....	77
4.2 Resultados de la aplicación de las técnicas microscópicas para la detección de parásitos intestinales .....	79
4.2.1 Concordancia entre las técnicas microscópicas con y sin concentración.....	79
4.2.2 Resultados de los participantes del estudio .....	82
4.2.2.1 Participantes VIH positivos .....	82
4.2.2.2 Participantes VIH negativos .....	91
4.2.3 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos .....	97
<b>5. DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES .....</b>	<b>105</b>
5.1 Concentración de la muestra vs visión en fresco.....	105

5.2 Identificación de parásitos por observación microscópica y técnica de detección de antígenos por inmunocromatografía rápida .....	106
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES.....</b>	<b>123</b>
6.1 Conclusiones.....	123
6.2 Recomendaciones .....	124
<b>CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Entamoeba histolytica, dispar y moshkovskii</i></b>	
<b>7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Entamoeba histolytica, dispar y moshkovskii</i> EN PACIENTES VIH POSITIVOS DE GUINEA ECUATORIAL</b>	<b>131</b>
7.1 Malabo –Isla de Bioko- .....	131
7.1.1 Descripción de los pacientes infectados por <i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i> .....	131
7.1.2 Identificación de especies de <i>Entamoeba</i> por PCR en muestras procedentes de participantes VIH positivos .....	132
7.1.3 Identificación de especies de <i>Entamoeba</i> por PCR en muestras procedentes de participantes VIH negativos.....	137
7.1.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos.....	137
7.1.5 Identificación de especies de <i>Entamoeba</i> por PCR en muestras procedentes de participantes seleccionados al azar .....	138
7.2 Bata –Región Continental- .....	140
7.2.1 Descripción de los pacientes infectados por <i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i> .....	140
7.2.2 Identificación de especies de <i>Entamoeba</i> por PCR en muestras procedentes de participantes VIH positivos .....	141
7.2.3 Identificación de especies por PCR en muestras procedentes de participantes VIH negativos.....	144
7.2.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos.....	145
7.2.5 Identificación de especies por PCR en muestras procedentes de participantes seleccionados al azar .....	145
7.3 Comparación de los resultados encontrados en las dos regiones .....	148
7.4 Secuenciación de los productos de amplificación de <i>Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii</i> .....	148
7.5 Concordancia entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico de <i>Entamoeba</i> spp. ....	149

7.5.1 Las frecuencias positivas encontradas en cada caso fueron las siguientes:.	149
<b>8. DISCUSION DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>dispar</i> y <i>moshkovskii</i></b> .....	157
<b>9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>dispar</i> y <i>moshkovskii</i></b> .....	167
9.1 Conclusiones.....	167
9.2 Recomendaciones .....	168
 <b>CAPÍTULO 6: TÉCNICAS MOLECULARES DE <i>Cryptosporidium spp</i></b>	
<b>10. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium spp.</i> EN GUINEA ECUATORIAL</b> .....	173
10.1 Determinación de especies de <i>Cryptosporidium</i> .....	174
10.1.1 Asociaciones encontradas en las dos regiones .....	176
10.1.2 Secuenciación de los productos de amplificación de <i>Cryptosporidium</i> ....	176
<b>11. DISCUSIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium spp.</i></b> .....	181
<b>12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>Cryptosporidium spp.</i></b> .....	187
12.1 Conclusiones.....	187
12.2 Recomendaciones .....	187
 <b>CAPÍTULO 7: GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Giardia duodenalis</i></b>	
<b>13. GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Giardia duodenalis</i> POR TÉCNICAS MOLECULARES</b> .....	193
13.1 Identificación de genotipos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	195
13.2 Determinación de asociaciones entre los genotipo de <i>Giardia duodenalis</i> y las variables del estudio .....	196
13.2.1 Resultados de los participantes VIH positivos .....	196
13.2.2 Resultados de los participantes VIH negativos .....	197
13.2.3 Resultado de las muestras recogidas al azar.....	197
13.2.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos .....	198
13.3 Concordancia entre las técnicas de ICR con o sin Visión directa .....	198

13.4 Secuenciación de los productos de amplificación de <i>Giardia</i> spp.....	200
<b>14. DISCUSIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Giardia duodenalis</i> POR TÉCNICAS MOLECULARES .....</b>	<b>205</b>
<b>15. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Giardia duodenalis</i> POR TÉCNICAS MOLECULARES .....</b>	<b>213</b>
15.1 Conclusiones.....	213
15.2 Recomendaciones .....	213

## **CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES**

<b>16. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>219</b>
---	------------

## **CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA**

<b>17. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>227</b>
-------------------------------	------------

## **CAPÍTULO 10: ANEXOS**

<b>18. ANEXOS .....</b>	<b>247</b>
Anexo 1. Ministerio de Sanidad y Política Social, España. Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior. ....	247
Anexo 2. BOE N° 286. ANEXO II.....	249
Anexo 3. MINSABS. Dirección General de Salud Pública y Planificación Sanitaria. ....	250
Anexo 4. Ficha de variables del estudio. ....	251
Anexo 5. Consentimiento informado y firmado. Muestras. ....	252
Anexo 6. Consentimiento informado y firmado. Fotos. ....	253
Anexo 7. MINSABS. Dirección General de Coordinación Multisectorial de lucha contra el VIH/SIDA.....	254
Anexo 8. MINSABS. Secretario General.....	255
Anexo 9. MINSABS. Ministro de Estado. ....	256
Anexo 10. OMS. EQG/MMB/09-566. ....	257
Anexo 11. OMS. EQG/MMB/10-679. ....	258
Anexo 12. Publicación.....	259

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla MM-1.</b> Esquemas del tratamiento antirretroviral.....	42
<b>Tabla MM-2.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>SSUrDNA</i> .....	54
<b>Tabla MM-3.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>SSUrRNA</i> .....	55
<b>Tabla MM-4.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>gp60</i> .....	56
<b>Tabla MM-5.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>tpi</i> .....	57
<b>Tabla MM-6.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>tpi-Sulaiman</i> .....	59
<b>Tabla MM-7.</b> Cebadores utilizados en la amplificación del gen <i><math>\beta</math>-giardina</i> .....	60
<b>Tabla MM-8.</b> Protocolo de tratamientos antiparasitarios intestinales.....	66
<b>Tabla VD-1.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Adultos. Isla de Bioko.....	71
<b>Tabla VD-2.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Niños. Isla de Bioko.....	72
<b>Tabla VD-3.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Datos generales. I. Bioko.....	72
<b>Tabla VD-4.</b> Variables sociológicas en participantes VIH positivos. Con residencia en la Isla de Bioko. ....	73
<b>Tabla VD-5.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Adultos. R. Continental.....	74
<b>Tabla VD-6.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y TARV. Niños. Región Continental.....	75
<b>Tabla VD-7.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y TARV. Datos generales. R. Continental.....	75
<b>Tabla VD-8:</b> Variables sociológicas en participantes VIH positivos de la Región Continental.....	76
<b>Tabla VD-9.</b> Variables sociológicas. Valor absoluto y relativo. VIH negativo. I. Bioko y R. Continental.....	78
<b>Tabla VD-10.</b> Variables demográficas. Valor absoluto y relativo. VIH negativo. Bioko y Continente.....	78
<b>Tabla VD-11.</b> Distribución de la infección por parásitos intestinales según el lugar de residencia. Isla/Continente.....	83
<b>Tabla VD-12.</b> Número de parásitos que se encuentran simultáneamente en los pacientes VIH+ Isla/Continente.....	83

<b>Tabla VD- 13.</b> Proporción de parásitos intestinales en pacientes VIH positivos en la Isla/Continente. ....	86
<b>Tabla VD-14.</b> Distribución de la infección por parásitos intestinales según el lugar de residencia. Isla/Continente. ....	91
<b>Tabla VD- 15.</b> Número de parásitos que se encuentran simultáneamente. Pacientes VIH-. Isla/Continente. ....	92
<b>Tabla VD-16.</b> Proporción de parásitos intestinales en pacientes VIH negativos. Isla/ Continente. ....	94
<b>Tabla VD-17.</b> OR para VIH+ e infección parasitaria, tomando como referencia VIH negativo. Isla de Bioko/R. Continental. ....	101
<b>Tabla RE-1.</b> Número de participantes infectados según los datos demográficos, estado inmunológico y lugar de residencia en la Isla de Bioko.....	132
<b>Tabla RE-2.</b> Especies de <i>Entamoeba</i> identificadas en muestras de los participantes de la I. Bioko. ....	135
<b>Tabla RE-3.</b> OR emparejado VIH+ y <i>Entamoeba</i> spp. Referencia VIH negativo. Isla de Bioko. ....	138
<b>Tabla RE-4.</b> Datos demográficos, estado inmunológico y residencia. <i>Entamoeba</i> spp. R. Continental. ....	140
<b>Tabla RE-5.</b> Proporción de especies de <i>Entamoeba</i> en el Continente en los pacientes VIH+/VIH-. ....	142
<b>Tabla RE-6.</b> OR emparejado VIH+ y <i>Entamoeba</i> spp. Referencia VIH negativo. R. Continental. ....	145
<b>Tabla RE-7.</b> Resultados de las distintas técnicas realizadas y su desviación típica.....	149
<b>Tabla RE-8.</b> Sensibilidad y especificidad de las técnicas. Técnica de referencia PCR. ....	150
<b>Tabla RE-9.</b> Sensibilidad y especificidad de la técnica de ICR. PCR para <i>E. histolytica</i> . ....	151
<b>Tabla RC-1.</b> Distribución de especies de <i>Cryptosporidium</i> según su localización.....	174
<b>Tabla RC-2.</b> Distribución de especies de <i>Cryptosporidium</i> y coinfección VIH. ....	175
<b>Tabla RC-3.</b> Familia alélicas y subtipos de <i>Cryptosporidium</i> detectados en el estudio en relación a los subtipos de referencia publicados en el GenBank.....	178
<b>Tabla RG-1.</b> Distribución de la amplificación positiva de los genes según su localización....	194
<b>Tabla RG-2.</b> Distribución de genotipos de <i>Giardia</i> según su localización.....	195
<b>Tabla RG-3.</b> Distribución de genotipos de <i>Giardia</i> y coinfección con VIH. ....	195
<b>Tabla RG-4.</b> Resultados de las distintas técnicas realizadas y su desviación típica. ....	199

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I-1.</b> Mapa de la República de Guinea Ecuatorial.....	1
<b>Figura I-2.</b> Pirámide poblacional de Guinea Ecuatorial.....	3
<b>Figura I-3.</b> Causas de carga de enfermedad. % total años de vida ajustados por discapacidad. G. E. ....	4
<b>Figura I-4.</b> Causas de muertes en todas las edades. Guinea Ecuatorial. ....	5
<b>Figura I-5.</b> Ciclo biológico de <i>Trichuris trichiura</i> . Fuente: CDC.....	8
<b>Figura I-6.</b> Ciclo biológico de <i>Ascaris lumbricoides</i> . Fuente: CDC.....	10
<b>Figura I-7.</b> Ciclo biológico de la Uncinaria. Fuente: CDC .....	11
<b>Figura I-8.</b> Ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i> . Fuente: CDC.....	13
<b>Figura I-9.</b> Ciclo biológico de <i>Schistosoma</i> spp. Fuente: CDC .....	14
<b>Figura I-10.</b> Ciclo biológico de <i>Entamoeba</i> spp. Fuente: CDC .....	17
<b>Figura I-11.</b> Ciclo biológico de <i>Giardia</i> spp. Fuente: CDC.....	20
<b>Figura I-12.</b> Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp. Fuente: CDC.....	23
<b>Figura MM-1.</b> Citómetro del Laboratorio de microbiología del Hospital Regional de Bata.....	41
<b>Figura VD-1.</b> Lugar de residencia de los participantes VIH positivos. Isla de Bioko. ....	73
<b>Figura VD-2.</b> Lugar de residencia de los participantes VIH positivo. Región Continental.....	76
<b>Figura VD-3.</b> Muestras positivas para al menos un parásito en los participantes de la Isla de Bioko.....	79
<b>Figura VD-4.</b> Parasitismo en la Isla de Bioko.....	80
<b>Figura VD-5.</b> Muestras positivas para al menos un parásito en los participantes de la R. Continental. ....	81
<b>Figura VD-6.</b> Parasitismo en la Región Continental.....	81
<b>Figura VD-7.</b> Diferencias entre microscopia con y sin concentración. Isla/Continente. ....	82
<b>Figura VD-8.</b> Helmintos patógenos: <i>Strongyloides</i> , <i>Schistosoma</i> y Uncinaria.....	85
<b>Figura VD-9.</b> Helmintos patógenos: <i>Trichuris trichiura</i> y <i>Ascaris lumbricoides</i> . ....	85
<b>Figura VD-10.</b> Protozoos oportunistas: <i>Chilomastix</i> , <i>Entamoeba coli</i> y <i>Blastocystis hominis</i> ..	89
<b>Figura VD-11.</b> Protozoos patógenos: <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> y <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> .....	93

<b>Figura VD-12.</b> Mapa georeferenciado de los distintos grupos de parásitos intestinales. Isla de Bioko.....	98
<b>Figura VD-13.</b> Mapa georeferenciado de los distintos grupos de parásitos intestinales. R. Continente.....	100
<b>Figura DVD-1.</b> Huevos de <i>Schistosoma</i> spp.....	113
<b>Figura DVD-2.</b> Río Borabecho, barrio Fishtown (Elá Nguema). Isla de Bioko.....	114
<b>Figura RE-1.</b> Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los productos de la amplificación de la segunda PCR de <i>E. moshkovskii</i> .....	133
<b>Figura RE-2.</b> Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los productos de amplificación de la segunda PCR de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .....	133
<b>Figura RE-3.</b> Especies de <i>Entamoeba</i> identificadas en el estudio. Participantes VIH+/VIH-. I. Bioko.....	134
<b>Figura RE-4.</b> Especies de <i>Entamoeba</i> identificadas en el total de participantes VIH+/VIH-. I. Bioko.....	134
<b>Figura RE-5.</b> Mapa georeferenciado de las distintas especies de <i>Entamoeba</i> . Isla de Bioko..	139
<b>Figura RE-6.</b> Especies de <i>Entamoeba</i> identificadas en el estudio. Participantes VIH+/VIH-. R. Continental.....	142
<b>Figura RE-7.</b> Especies de <i>Entamoeba</i> identificadas en el total de participantes VIH+/VIH-. Continente.....	143
<b>Figura RE-8.</b> Mapa georeferenciado de las distintas especies de <i>Entamoeba</i> . R. Continente.	147
<b>Figura RE-9.</b> Técnica de la inmunocromatografía rápida. Test triple.....	150
<b>Figura RE-10.</b> Curva ROC de las técnicas de microscopía e ICR para PCR de <i>Entamoeba</i> spp.....	151
<b>Figura RE-11.</b> Curva ROC de las técnica de ICR para PCR de <i>E. histolytica</i> .....	152
<b>Figura RC-1.</b> PCR del gen <i>SSU rRNA</i> y PCR del gen <i>GP60</i> .....	173
<b>Figura RC-2.</b> RFLP con <i>SspI</i> y <i>VspI</i> de los amplicones del gen <i>SSU-rRNA</i> .....	174
<b>Figura RG-1.</b> Segunda PCR del gen $\beta$ - <i>giardina</i> .....	194
<b>Figura RG-2.</b> Segunda PCR del fragmento 530 pb.....	195
<b>Figura RG-3.</b> Curva ROC de las técnicas de microscopía e ICR para PCR de <i>Giardia</i> spp... 200	



## **CAPÍTULO 1: *INTRODUCCIÓN***



## ***INTRODUCCION***

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DATOS GEOGRÁFICOS E INDICADORES DE DESARROLLO HUMANO DE LA REPÚBLICA DE GUINEA ECUATORIAL

### Datos geográficos



Figura I-1: Mapa de la República de Guinea Ecuatorial.

**La República de Guinea Ecuatorial** está situada en el **África Subsahariana**, al oeste del África Central, concretamente en el Golfo de Guinea, en el Océano Atlántico. Ocupa el 0,09% de la superficie del continente africano. Tiene una frontera marítima con la República Federal de Nigeria y Sao Tomé y Príncipe y tiene una extensión superficial de 28.051 km<sup>2</sup> que se distribuye en dos regiones (Figura I-1):

**La Región Continental**, limita al norte con Camerún, al sur y al este con Gabón, tiene una superficie de 26.000 km<sup>2</sup>. La región continental está formada por altiplanos accidentados por algunos macizos que van descendiendo hasta la costa, que por lo general es baja y arenosa. Pertenecen a esta región las Islas de Corisco de 15 km<sup>2</sup>, Elobey Grande 2,27 km<sup>2</sup> y Elobey Chico de 0,19 km<sup>2</sup>. Estas dos últimas islas inhabitables.

**La Región Insular** formada por varias islas: Bioko, Annobón y los islotes adyacentes. La Isla de Bioko es de origen volcánico, con una fertilidad excepcional, tiene una superficie de 2.017 km<sup>2</sup>, en ella se encuentra la capital de la nación, Malabo, y está separada 270 millas marinas de la Región Continental.

La Isla de Annobón, con sus 17 km<sup>2</sup> se encuentra al Sur de la República de Sao Tomé y Príncipe, a 600 millas de Malabo. Presenta un relieve abrupto, poco favorable a la producción agrícola.

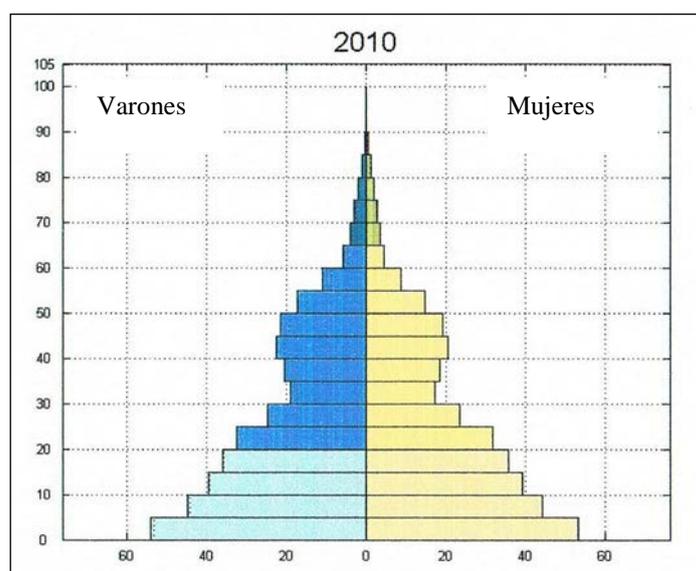
El país tiene un clima ecuatorial, muy lluvioso, con una temperatura media anual de 25° C y precipitaciones de hasta 2.000 mm/año.

## **Algunos indicadores de desarrollo humano de Guinea Ecuatorial**

### **Población:**

Según los datos del III Censo General de Población y Viviendas de 2001, la estimación para el 2010 era de una población total de Guinea Ecuatorial de 1.622.000 habitantes. Según datos del Informe sobre Desarrollo Humano del año 2010, la población total, considerando ambos sexos, es de 720.200 habitantes, con una población urbana del 39,9%. La tasa de crecimiento anual es del 2,6%, con una edad media de la población de 19,1 años, y una tasa de fecundidad global de 5,36 hijos por mujer (World population prospects, 2008).

Esto significa que la distribución de la población presenta características de una estructura joven, cuya pirámide de edades tiene una base ensanchada y una cúspide fina (Figura I-2), confirmando así su elevada fecundidad y natalidad, así como una mortalidad bastante elevada que implica la existencia de mucha población en las primeras edades de vida y pocos ancianos.



**Figura I-2:** Pirámide poblacional de Guinea Ecuatorial.

**Fuente:** United Nations Department of Economic and Social Affairs/Population Division. *World Population Prospects: The 2010, Volume II: Demographic Profiles*

## **Economía**

Guinea Ecuatorial está situado entre los países de desarrollo medio, ocupando el número 117, con un PIB per cápita de 28.857 (PPA en US\$ de 2005), un ingreso nacional bruto (INB) de 17.608 \$ (IDH, 2010). La economía está basada fundamentalmente en la explotación forestal (madera) y petrolera.

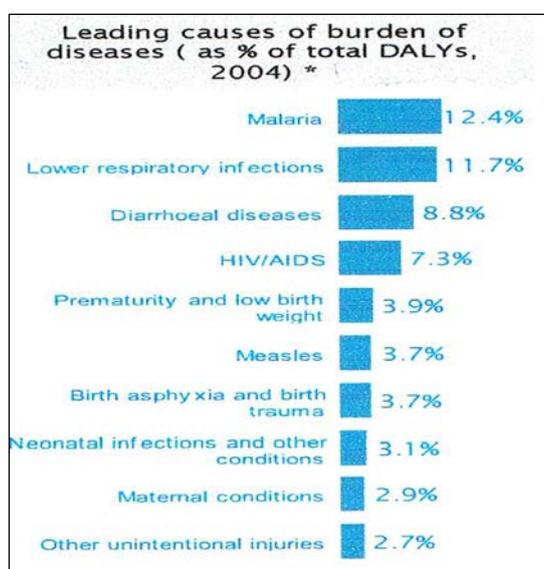
## **Educación**

La tasa de alfabetización de adultos (mayores de 15 años) es del 93,3%, 7,7 años esperados de instrucción y un promedio de 5,4 años de educación por habitante y con un gasto público en educación del 0,7% del PIB (IDH, 2010).

## Salud

La esperanza de vida al nacer es de 53 años para varones y 54 años para mujeres. La tasa de mortalidad de niños menores de cinco años es de 145 por 1.000 nacidos vivos y entre 15 a 60 años es de 373 en varones y 355 en mujeres por 1000 habitantes y la mortalidad materna es de 280 por 100.000 nacidos vivos (Observatorio Mundial de la Salud, 2009). El gasto público en salud es del 1,7% del PIB (IDH, 2010).

Las principales causas de carga de enfermedad en el país son, por orden prevalencia: malaria, infecciones respiratorias bajas, enfermedades diarreicas y VIH/SIDA (Observatorio africano de salud, 2010), como se muestran en la Figura I-3.



**Figura I-3:** Causas de carga de enfermedad. % total años de vida ajustados por discapacidad. G. E.

**Fuente:** African Health Observatory at [www.afro.who.int](http://www.afro.who.int)

La mayoría de estas enfermedades también constituyen las principales causas de muerte: infecciones respiratorias de vías bajas, malaria, enfermedades diarreicas, VIH/SIDA y tuberculosis (Figura I-4; WHO. World Health Statistics, 2010).

**Causes of Death**

Top ten causes of death, all ages  
Equatorial Guinea, 2002

Causes	Deaths		Years of Life Lost
	(000)	(%)	(%)
All causes	7	100	100
HIV/AIDS	1	17	24
Malaria	0	11	14
Diarrhoeal diseases	0	6	7
Lower respiratory infections	0	6	6
Perinatal conditions	0	5	7
Measles	0	5	6
Cerebrovascular disease	0	4	2
Ischaemic heart disease	0	4	1
Tuberculosis	0	3	2
Road traffic accidents	0	2	3

Source: [Death and DALY estimates by cause, 2002](http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls)  
<http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls>

**Figura I-4:** Causas de muertes en todas las edades. Guinea Ecuatorial.

El programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA, ONUSIDA, estimó que en 2009, 33,3 millones de personas vivían con el VIH, de las cuales el 22,5 millones correspondían a África Subsahariana. De los 2,6 millones de nuevas infecciones por el VIH en el mundo, las que aparecen en esta Región representaban el 69%. Finalmente, hubo 1,8 millones de fallecimientos por causas relacionadas con el SIDA, de ellos 1,3 millones correspondía al África Subsahariana (UNAIDS, 2009).

Tanto en la escala como en el alcance, las epidemias varían en forma significativa de un país a otro de África Subsahariana. La prevalencia del VIH en Camerún es del 5,3%, República Centroafricana el 4,7% y Gabón 5,2% (UNAIDS, 2010).

En Guinea Ecuatorial, la seroprevalencia de VIH en población adulta es del 5,2%, catalogado por ONUSIDA como país de epidemia generalizada, teniendo como vía principal de transmisión la sexual (UNAIDS, 2010). Con estas cifras, el número estimado de personas que necesitan ARV es de 6.600 (WHO guidance, 2010) y el número estimado de personas que reciben ARV alcanza el 2.900 (Global Fund, 2011).

## **1.2 RELACIÓN VIH/SIDA E INFECCIONES PARASITARIAS INTESTINALES**

Las enfermedades diarreicas son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países tropicales en desarrollo, siendo prioritario su control y prevención (Fuentes *et al.*, 2007). Guinea Ecuatorial es zona endémica en numerosas parasitosis que vienen a agravar el estado de salud de las personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (PVVIH) (Sun, 1988; Hunter & Nichols, 2002).

Las infecciones por parásitos son una causa frecuente de diarrea crónica en los pacientes con inmunosupresión (Scowden *et al.*, 1978; Heyworth, 1996).

*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* o *Strongyloides stercoralis* son los parásitos intestinales más importantes que se subrayan como principales causas de la diarrea en pacientes con VIH, aunque también, lo pueden ser *Trichuris trichiura*, Uncinarias y *Ascaris lumbricoides* (Nissapatorn & Sawangjaroen, 2011). Además de estas, hay múltiples infecciones parasitarias intestinales oportunistas que podrían dar lugar a enteritis graves y a diarrea crónica, con aumento de la morbimortalidad (Siddiqui *et al.*, 2007).

También se ha relacionado el aumento de la carga viral del VIH con la alteración inmunológica asociada a parasitosis intestinal crónica por helmintos en las personas seropositivas (Harms & Feldmeier, 2002).

Guinea Ecuatorial es un país tropical, debido a su ubicación y clima. Dentro del país, la Región Continental presenta unas características similares a las del resto de los países del área Subsahariana, mientras que la Isla de Bioko constituye un ecosistema único. El auge económico basado en la extracción del petróleo aumenta cada día la inmigración en la capital, Malabo, situada en Bioko, provocando el hacinamiento de la población, sobre todo, en la zona del cinturón urbano, lo que favorece la diseminación de parásitos intestinales y la llegada de especies parasitarias no autóctonas a la isla, como es el caso de la schistosomiasis.

### **1.2.1 Helmintos patógenos**

Las helmintiasis transmitidas por el suelo (geohelminetos), comúnmente conocidas como lombrices intestinales, son las infecciones comunes en todo el mundo, especialmente en los países tropicales y afectan sobre todo, a las comunidades más desfavorecidas. La infección es causada por: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* y Uncinarias (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*).

Las enfermedades que producen tienen una gran repercusión sanitaria y socio-económica y constituyen un problema importante de salud pública en los países en vías de desarrollo. Las estimaciones recientes sugieren que las infecciones transmitidas por helmintos transmitidos por el suelo, afecta a más de 2.000 millones de personas en todo el mundo, *Ascaris lumbricoides* infecta a 1.221 millones de personas, *Trichuris trichiura* a 795 millones y las Uncinarias (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) a 740 millones (De Silva *et al.*, 2003). Se estima que el mayor número de infecciones se da en el África subsahariana, América, China y el este de Asia (Awasthi *et al.*, 2003; Brooker *et al.*, 2006; Hotez *et al.*, 2006; WHO, 2006). La prevalencia de infección por *Strongyloides* es desconocida, pero se estima que hay entre 3 y 100 millones de personas infectadas (CDC, 2012).

La vía de transmisión es por ingestión de los huevos que se encuentran en suelos contaminados (*Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*) o por la penetración activa de larvas a través de la piel (Uncinaria y *Strongyloides*).

Los helmintos transmitidos por el suelo producen una amplia gama de síntomas que incluyen manifestaciones intestinales (diarrea, dolor abdominal), malestar general y debilidad que puede afectar la capacidad de trabajo, el aprendizaje y al crecimiento físico de niños y adultos. Las Uncinarias causan la pérdida crónica de sangre intestinal que se traduce en anemia, que se agrava en países como el nuestro, endémico también de malaria.

Los 300 millones de personas aproximadamente, afectadas por una elevada carga parasitaria debida a infecciones por helmintos, sufren una grave morbilidad que se traduce en más de 150.000 muertes al año (Crompton 1999; Montresor *et al.*, 2002).



La hembra es ovípara. Los huevos no embrionados se eliminan en las heces y pasan al suelo. En el suelo, los huevos se desarrollan pasando por dos etapas celulares, una etapa avanzada de escisión y luego una de embrionado, los huevos se vuelven infectantes entre los 15 a 30 días, cada huevo contienen una larva infectante. Cuando el hospedador ingiere estos huevos (por la tierra, las manos y por los alimentos contaminados), los huevos eclosionan en el intestino del huésped y liberan las larvas que migran hacia el intestino grueso, donde continúa el desarrollo hasta la madurez y se establecen como gusano adulto en el colon (Figura I-5). Los gusanos adultos (miden aproximadamente 4 cm de largo) viven en el ciego y colon ascendente. El extremo anterior del parásito se inserta en el epitelio de la mucosa. Las hembras empiezan a ovipositar a los 60 a 70 días después de la infección. Las hembras, en el ciego, emiten entre 3.000 y 20.000 huevos por día. Los parásitos adultos pueden vivir hasta 10 años.

### ***Epidemiología de Trichuris trichiura.***

Es el tercer gusano redondo más común en los seres humanos a nivel mundial, con las infecciones más frecuentes en zonas con clima tropical y con prácticas de saneamiento deficientes, así como entre los niños.

En los pocos estudios realizados en Guinea Ecuatorial ya se informaba que *T. trichiura* era uno de los helmintos que más infecciones parasitarias intestinales producía en la población con el 32,0% (Fuentes *et al.*, 2007). Roche & Benito, 1999 dan un porcentaje de 36,4% en la zona urbana y el 25,5% en la zona rural.

En las infecciones leves puede ser difícil hallar los huevos de *T. trichiura* en las heces y deben utilizarse procedimientos de concentración (Ash & Orihel, 2010).

### 1.2.1.2 *Ascaris lumbricoides*

#### Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*

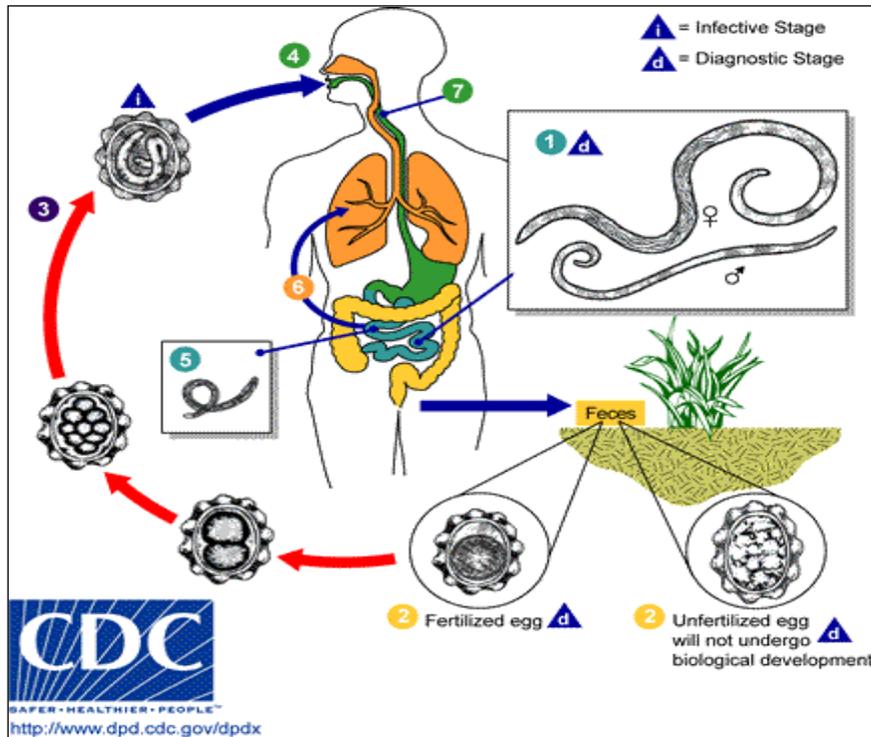


Figura I-6: Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*. Fuente: CDC

Los gusanos adultos viven en la luz del intestino delgado. Una hembra puede producir alrededor de 200.000 huevos por día, que se eliminan en las heces. Los huevos no fecundados pueden ser ingeridos y no infectantes. Los huevos se desarrollan en el suelo durante 2 a 3 semanas donde se hacen fértiles o embrionados y pasan a ser infectantes, dependiendo de las condiciones ambientales óptimas (suelo húmedo, cálido y sombreado). Cuando el huésped ingiere estos huevos, las larvas emergen en el intestino delgado y migran durante 8 a 9 días a través del hígado y los pulmones. Las larvas maduran en los pulmones (10 a 14 días), penetran en las paredes alveolares, ascienden por el árbol bronquial a la garganta, y se degluten. Al llegar al intestino delgado, se transforman en gusanos adultos (Figura I-6). El período previo a la sintomatología es de 2 meses. Los machos adultos viven menos de un año; la hembra vive entre 12 y 18 meses.

## ***Epidemiología de Ascaris lumbricoides***

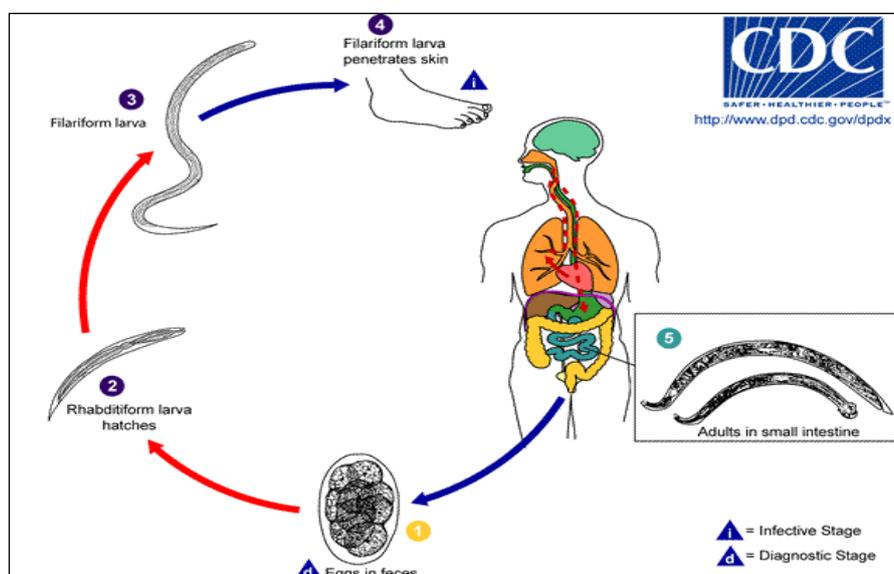
*Ascaris lumbricoides* es el mayor nematodo (gusano redondo) que parasita el intestino humano (las hembras adultas miden entre 20 a 35 cm y el macho adulto entre 15 a 30 cm).

La infección por *Ascaris lumbricoides* es la más común de las infecciones por helmintos humanos. Su distribución es mundial, aunque tienen una alta prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales; sobre todo, en las zonas con saneamiento limitado.

Las proporciones encontradas de *Ascaris lumbricoides* en los estudios realizados en Guinea Ecuatorial son elevadas, y alcanzan el 45,8% en la zona rural y el 31,4% en la urbana (Roche & Benito, 1999), con el 11,8% en pacientes VIH positivos (Fuentes *et al.*, 2007).

### **1.2.1.3 Uncinarias**

#### ***Ciclo biológico de Uncinaria.***



**Figura I-7:** Ciclo biológico de la Uncinaria. Fuente: CDC

La hembra es ovípara. Los huevos se eliminan con las heces contaminando el suelo, donde se embrionan y maduran en condiciones favorables (humedad, calor, sombra). Al cabo de 1 a 2 días salen las larvas que alcanzan el tercer estadio infectante después de 5 a 10 días. Estas larvas pueden sobrevivir de 3 a 4 semanas en condiciones ambientales favorables. El ser humano adquiere la infección cuando la larva penetra en la piel, migra a través de los vasos sanguíneos al corazón y luego a los pulmones. Penetran en los alvéolos pulmonares, ascienden el árbol bronquial a la faringe y se degluten. Las larvas llegan al intestino delgado, donde residen y se convierten en adultas (Figura I-7). Los gusanos adultos viven en la luz del intestino delgado, donde se adhieren a la pared intestinal provocando la pérdida de sangre del huésped. El parásito adulto puede vivir hasta 15 años, pero lo habitual es que viva entre 3 y 5 años. La mayoría de los gusanos adultos se eliminan en 1 a 2 años, pero la longevidad puede alcanzar varios años.

### ***Epidemiología de la Uncinaria.***

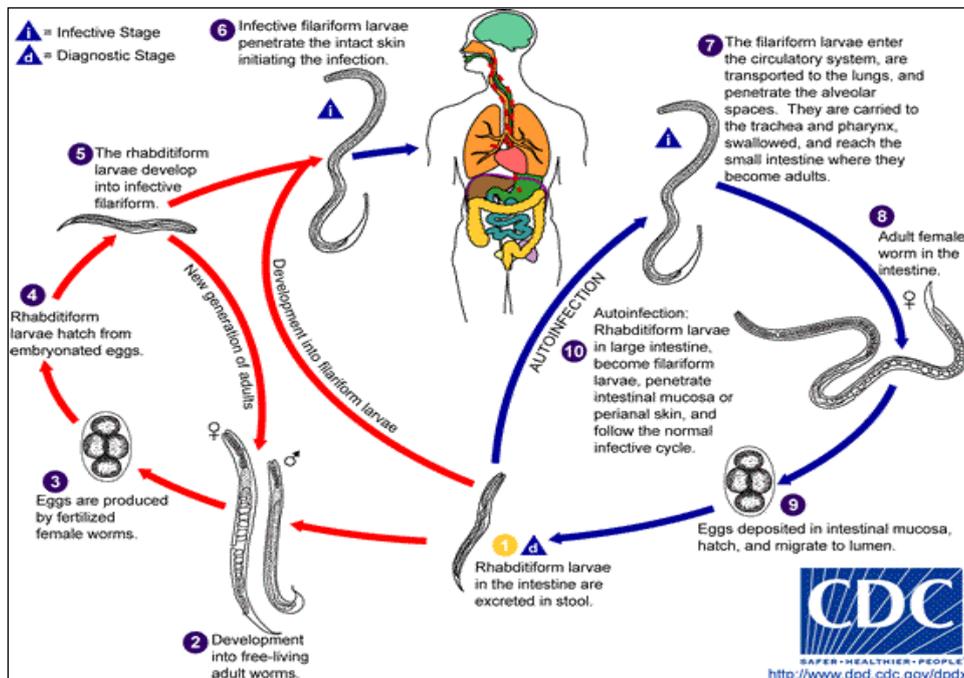
Las Uncinarias presentan distribución mundial, principalmente en zonas con clima húmedo y cálido.

En los estudios realizados en Guinea Ecuatorial, la proporción era baja, de 0,9% en la zona rural y 2,9% en la urbana (Roche & Benito, 1999).

En el diagnóstico, si los huevos eclosionan en las heces, como consecuencia de una demora en el examen fecal, se debe diferenciar el primer estadio larvario de la larva de *S. stercoralis*, que normalmente se elimina con las heces. La larva del primer estadio de Uncinarias presenta un canal bucal largo y un primordio genital no discernible. En la larva de *Strongyloides*, en cambio, el canal bucal es corto y el primordio genital es prominente.

### 1.2.1.4 *Strongyloides stercoralis*

#### Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*



**Figura I-8:** Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*. Fuente: CDC

El ciclo de vida de *Strongyloides* es más complejo que el de la mayoría de los nematodos, con su alternancia de ciclo de vida libre y ciclo parasitario, y su potencial de autoinfección y multiplicación dentro del huésped (Figura I-8).

La hembra deposita los huevos parcialmente embrionados, de cubierta delgada, en la mucosa. Las larvas rhabditoides eclosionan en el epitelio mucoso del intestino delgado, penetran en la luz intestinal, se eliminan en las heces y continúan su desarrollo en el suelo. En éste puede pasar al tercer estadio filariforme infectante (ciclo directo) o dar lugar a una generación de vida libre de gusanos adultos hembras y machos (ciclo indirecto). La hembra de vida libre produce huevos que se embrionan, eclosionan y desarrollan larvas filariformes.

La infección humana se produce cuando la larva filariforme de tercer estadio atraviesa la piel. La hembra es partenogenética y madura en el epitelio mucoso del intestino delgado en un mes aproximadamente; después comienza a producir huevos. La larva de primer estadio puede pasar al tercer estadio dentro del intestino en pacientes

inmunodeprimidos o tratados con corticoides e iniciar una autoinfección interna por invasión del íleon inferior y el colon. En estos casos, la estrogiloidosis puede ser fulminante y mortal (Ash & Orihel, 2010).

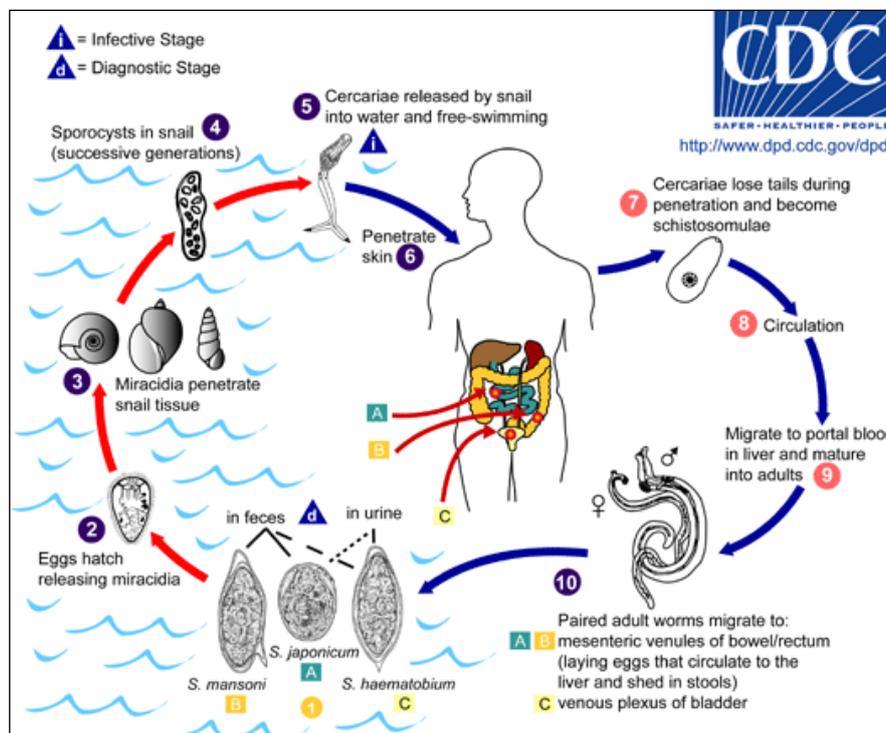
### ***Epidemiología de Strongyloides stercoralis***

La distribución de la infección por *Strongyloides* se da en áreas tropicales y subtropicales, pero también se puede producir en las zonas templadas, siendo más frecuente en las zonas rurales y en los grupos de población con niveles socioeconómicos más bajos.

En los estudios realizados en Guinea Ecuatorial, la proporción fue del 0,2% en el área rural y el 0,8 en la urbana (Roche & Benito, 1999) y en el otro alcanzó el 7,8% en los pacientes VIH positivos (Fuentes *et al.*, 2007).

### **1.2.1.5 *Schistosoma* spp.**

#### ***Ciclo biológico de Schistosoma spp.***



**Figura I-9:** Ciclo biológico de *Schistosoma* spp. Fuente: CDC

Los huevos embrionados se eliminan con las heces en el agua donde eclosionan y liberan los miracidios que invaden al caracol que actúa como hospedador intermediario. En el caracol pasa por dos etapas de desarrollo hasta convertirse en cercarias. Las cercarias son liberadas en el agua, se mueven libremente en ésta e invaden la piel de los seres humanos. Cuando la cola de la cercaria se pierde durante la invasión de la piel, pasa al estadio larvario conocido como esquistosómulo. El esquistosómulo migra a través de los pulmones y el hígado y por último, los parásitos alcanzan la madurez en las venas mesentéricas superior e inferior, se aparean, y las hembras comienzan la producción de huevos (Figura I-9).

### ***Epidemiología de Schistosoma spp.***

Las diferentes especies de *Schistosoma* se encuentran distribuidas en determinadas áreas. *Schistosoma mansoni* se encuentra en algunas partes de Sudamérica y el Caribe, África y el Oriente Medio; *S. haematobium* en África y el Medio Oriente, y *S. japonicum* en el Lejano Oriente. *Schistosoma mekongi* y *S. intercalatum* se encuentran focalmente en el Sudeste de Asia central y África occidental, respectivamente.

La carga mundial que tiene la esquistosomosis se ha expresado con el número de personas infectadas (200-209 millones) y con el número de personas que viven en países endémicos en riesgo de adquirir la infección (600-779 millones) (Chitsulo *et al.*, 2000; Steinmann *et al.*, 2006).

En cuanto al impacto de esta enfermedad, está considerada como la segunda enfermedad parasitaria más devastadora después de la malaria. La esquistosomosis es considerada como una infección incluida en las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) (OMS).

Debido a la participación de caracoles que se encuentran en aguas dulces como hospedadores intermediarios, la infección se adquiere en aguas dulces contaminadas.

En los estudios realizados en Guinea Ecuatorial, se encuentra descrita una proporción de esquistosomosis del 0,2 en el área urbana (Roche & Benito, 1999) en la Isla de Bioko y ausencia en el área rural (en este estudio, los casos positivos procedían todos de la Región Continental); 21,2% en Bata (Simarro *et al.*, 1990) y en el Fuentes *et al.*, en el

2007 no se detectó en los pacientes VIH positivos de Malabo y Bata infección por *Schistosoma*.

### **1.2.2 Protozoos patógenos**

Las infecciones intestinales por protozoos son comunes en los seres humanos y en todo el mundo, aunque más frecuentes y de mayor importancia en la infancia, el embarazo y en coinfección con el SIDA.

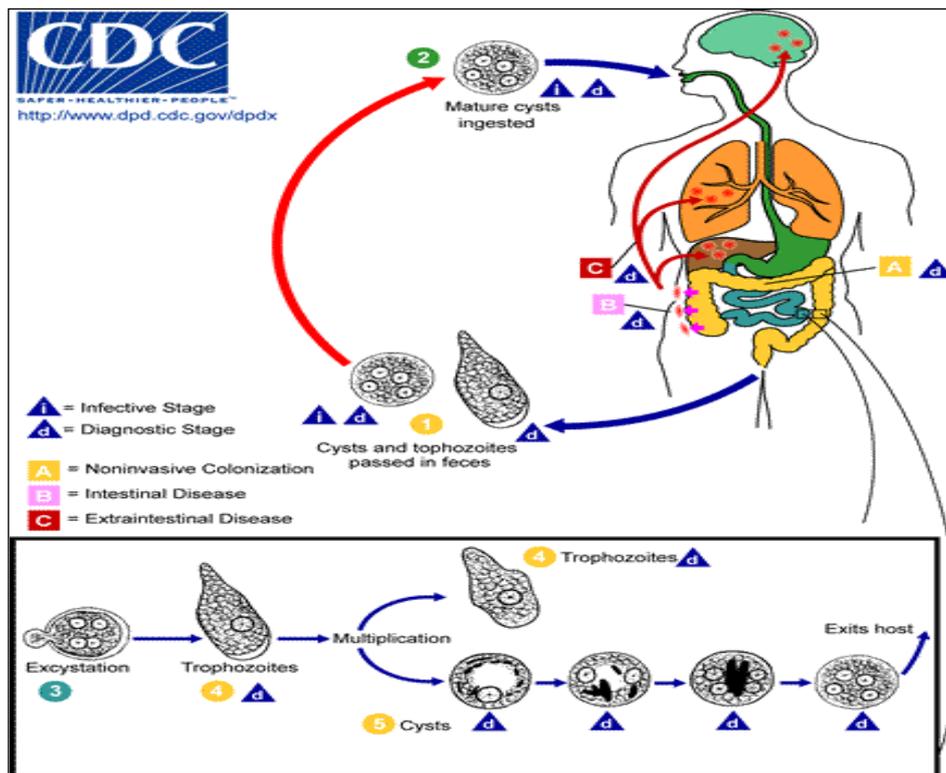
La morbimortalidad que producen es elevada, con más de 58 millones de casos al año de diarrea infantil por protozoos (WHO /CDS/IPI, 1991).

En septiembre de 2004, *Giardia* y *Cryptosporidium* se incluyeron en la "Iniciativa de Enfermedades Olvidadas". Con la esperanza de que los métodos moleculares generarían ideas significativas sobre la biología, la epidemiología y la interacción huésped-parásito sobre *Giardia* y *Cryptosporidium*.

#### **1.2.2.1 *Entamoeba* spp.**

##### ***Ciclo biológico de Entamoeba spp.***

Las diferentes especies de *Entamoeba* se transmiten de forma directa por ingestión de los quistes, pero también puede transmitirse por vía feco-oral. El hombre se infecta por la ingestión de los quistes maduros que atraviesan el estómago, donde sufren la acción de los jugos gástricos. La ruptura del quiste tiene lugar en la región del íleon terminal o en el colon, dando origen a los trofozoítos.



**Figura I-10:** Ciclo biológico de *Entamoeba* spp. Fuente: CDC

En muchos casos, los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (infección invasiva) de personas portadoras asintomáticas, emitiendo quistes en las heces (Figura I-10). En algunos pacientes, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través del torrente sanguíneo alcanzan zonas extra intestinales como el hígado, pulmones y mucho menos frecuente otras localizaciones (enfermedad extra intestinal), con las consiguientes manifestaciones clínicas.

### ***Epidemiología de Entamoeba spp.***

*Entamoeba* ha sido descrita como la tercera causa de mortalidad en el mundo debida a infección por parásitos protozoarios, después de la malaria y la esquistosomosis (Walsh, 1986; Anonymous, 1997). Su distribución es mundial, aunque es especialmente prevalente en zonas tropicales y subtropicales con condiciones higiénico-sanitarias deficientes.

El género *Entamoeba* está compuesto por numerosas especies diferentes, 6 de las cuales son las más frecuentemente descritas por su localización intestinal: *E. histolytica*, *E.*

*dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. coli* y *E. hartmanni*. La especie *E. polecki* se encuentra fundamentalmente en el intestino de ganado porcino y en monos. Las tres primeras resultan morfológicamente indistinguibles, pero presentan diferencias genéticas y bioquímicas. *E. histolytica* está descrita como claramente patógena, mientras que *E. dispar* se considera no patógena y *E. moshkovskii*, la menos estudiada, también es no patógena aunque en algunos estudios se comenta que podría producir algún trastorno intestinal (Fotedar *et al.*, 2007). Se demostraron diferencias genéticas de estas especies con las técnicas de biología molecular (Tannich & Burchard, 1991; Diamond & Clark, 1993).

Su diagnóstico se realiza, por lo general, por visualización microscópica del parásito, mediante una preparación que resulta simple y de bajo coste, esto hace que sea difícil conocer la prevalencia de *E. histolytica*, *dispar* y *moshkovskii* a nivel mundial y local, dado que la diferenciación de las tres especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* morfológicamente idénticas, no se puede realizar por microscopia.

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Anonymous, 1997), en 1997, recomienda utilizar técnicas que permitan distinguir entre al menos *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que *E. histolytica* es responsable de todos los casos de enfermedad invasora, colitis y absceso hepático, pero también, en muchas ocasiones, de colonización asintomática, mientras que *E. dispar* sólo coloniza el tracto digestivo y no causa enfermedad. Aunque se ha descrito algún caso en que *E. dispar* resulta responsable de síntomas o de infección oportunista (Fotedar *et al.*, 2007).

La *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la disentería amebiana y de los abscesos hepáticos y responsable de hasta 100.000 muertes cada año en todo el mundo (Ali *et al.*, 2008), mientras que la *E. dispar* está considerada como no patógena, por lo que no precisa de tratamiento (Singh *et al.*, 2009), aunque se ha observado su mayor prevalencia respecto a *E. histolytica* (Chacin-Bonilla, 2010). *E. moshkovskii* conocida como ameba de vida libre en aguas residuales (Tshalaia, 1941; Scaglia *et al.*, 1983; Clark & Diamond, 1991), ha sido recientemente encontrada infectando a humanos (Clark & Diamond, 1991; Haque *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2003; Parija & Khairnar, 2005; Fotedar *et al.*, 2007; Tanyuksel *et al.*, 2007; Ayed, 2008; Beck *et al.*, 2008) y frecuentemente asociada a *E. dispar* (Chacín-Bonilla, 2010). En la mayoría de los países no hay estudios de la prevalencia de *E. moshkovskii*.

Pero, para llevar a cabo la diferenciación, es preciso aplicar técnicas de PCR (Tannich & Burchard, 1991; Diamond & Clark, 1993) no disponibles en muchos países en vías de desarrollo. Por otra parte, el control de la diseminación de la amebiasis requiere su detección e identificación en personas infectadas asintomáticas e identificar igualmente las fuentes de infección.

La prevalencia de *Entamoeba* spp. en Guinea Ecuatorial, en los pocos estudios realizados en el país ha sido: en la Isla de Bioko 14,9% en las zonas rurales y el 32,7% en las urbanas (Roche & Benito, 1999) con técnicas microscópicas; Fuentes et al. (2007) aportan el dato de 9,2% para las dos regiones Bioko y Continente, siendo el porcentaje de *E. histolytica* el 26,0% por ELISA en personas VIH positivas.

En cuanto al mecanismo de transmisión, tanto *E. histolytica* como *dispar* y *moshkovskii* son parásitos intestinales, por lo que, su principal vía de transmisión es feco-oral (Ali et al., 2008), si bien *E. moshkovskii* podría transmitirse también por vía hídrica. La forma más frecuente de transmisión es a través de los alimentos, o del agua contaminada con los quistes, o la transmisión de persona a persona. Se han descrito casos de contagios dentro de la misma familia (Gatti et al. 1995; Vreden et al. 2000) y por prácticas de sexo oral (Thompson et al. 1983). Por otro lado, los quistes pueden ser diseminados por artrópodos, lo que podría indicar que estos insectos pueden jugar un papel en la transmisión del parásito (Tanyuksel & Petri 2003).

#### **1.2.2.2 *Giardia* spp.**

Los quistes son la forma resistente del parásito y responsables de la transmisión de la giardiasis. Tanto los quistes como los trofozoítos se pueden encontrar en las heces (etapa de diagnóstico). Los quistes son resistentes y pueden sobrevivir varios meses en agua fría.

#### ***Ciclo biológico de Giardia* spp.**

La infección se transmite de forma directa por la ingestión de quistes en el agua y alimentos contaminados, o por la vía feco-oral (manos o formites) (Figura I-11), debido a la baja dosis infectiva, la transmisión puede ocurrir con tan solo 10 quistes infectantes (Rendtorff, 1954).

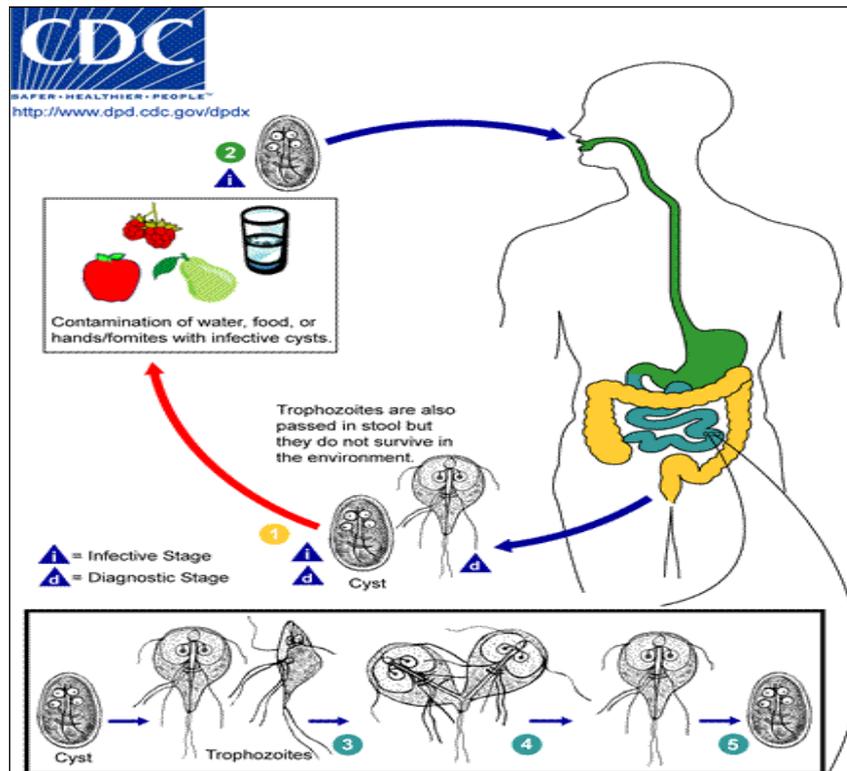


Figura I-11: Ciclo biológico de *Giardia* spp. Fuente: CDC

### ***Epidemiología de Giardia spp.***

*Giardia* puede ser transmitida a seres humanos a través de cualquier mecanismo que suponga la ingestión de quistes por un huésped susceptible (Smith, 2004). La transmisión a través del agua contaminada, agua de consumo y las aguas recreativas, ha sido documentada (Smith & Grimason, 2003; Savioli *et al.*, 2006; Karanis *et al.*, 2007), también se han originado brotes de giardiasis de origen alimentario, como resultado de la contaminación de los alimentos (Osterholm *et al.*, 1981; Islam, 1990). Además es posible su transmisión por las moscas (Rendtorff & Holt, 1954; Doiz *et al.*, 2000; Graczyk *et al.*, 2003), que contaminan los alimentos después de que hayan estado en contacto con heces humanas o de animales. La actividad sexual oro-anal es otro mecanismo de transmisión de la giardiasis (Meyer *et al.*, 1979). Se ha sugerido que los animales podrían ser fuentes de la transmisión de la infección por giardiasis en humanos (Traub *et al.*, 2004; Savioli *et al.*, 2006), pero han de realizarse más investigaciones para determinar su mecanismo.

La giardiosis es una infección endémica en todo el mundo. Su prevalencia varía entre menos del 1,0% y más del 50,0%, guardando relación con las condiciones de infraestructura sanitaria y hábitos higiénicos de la población (Ortiz *et al.*, 2001).

Las infecciones por *Giardia* son muy comunes en los niños en los países en desarrollo (Farthing, 1994; Rabbani & Islam, 1994). En los países desarrollados, la prevalencia tiene picos en los grupos de edad entre 1-4 años (Flannagan, 1992) y de nuevo entre la franja de 20 a 40 años que en parte corresponde al grupo de personas que están al cuidado de los niños y de los que realizan viajes turísticos a países endémicos de la infección.

En los países en desarrollo, la prevalencia de giardiosis en pacientes con diarrea es de aproximadamente el 20% (Islam, 1990). La cifra para los países desarrollados oscila del 3% (Adán, 1991; Farthing, 1994) al 7% (WHO). En Guinea Ecuatorial la prevalencia, según los estudios llevados a cabo es de 7,2% en la zona rural y del 8,6% en la urbana de la Isla de Bioko (Roche & Benito, 1999) y el 9,2% en los pacientes VIH positivos (Fuentes *et al.*, 2007).

Debido a la gran propagación y difusión del parásito, la giardiosis es una de las posibles causas de diarrea del viajero, diarreas en los inmigrantes o en las adopciones internacionales, especialmente en personas provenientes de países con altos niveles de endemicidad, como África (Ekdahl & Andersson, 2005).

Las técnicas de biología molecular han permitido poner de manifiesto la amplia diversidad genética de *Giardia duodenalis*. Las cepas que afectan a los seres humanos se pueden agrupar en dos principales genotipos genéticos o asociaciones, que han sido nombrados como genotipos A y B (Thompson RC *et al.*, 2000); en los últimos años, se ha descrito el hallazgo de otros genotipos como el E, C y el D, cuyos hospedadores habituales son ganado, perros y gatos, y seres humanos (Sulaiman *et al.*, 2001; Foronda *et al.*, 2008). En Guinea Ecuatorial no se han llevado a cabo estudios que pongan de manifiesto los genotipos existentes de la infección por *Giardia* en la población.

### **1.2.2.3 *Cryptosporidium* spp.**

Hay muchas especies de *Cryptosporidium* que infectan a los seres humanos y a una amplia gama de animales. A pesar de que las especies de *C. parvum* y *C. hominis* sean

las que más comúnmente producen enfermedad en los seres humanos, también se han reportado infecciones humanas por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. ubiquitum* y *C. suis* (Cacciò, 2005; Llorente *et al.*, 2005; Chalmers *et al.*, 2009, Cieloszyk *et al.*, 2012).

### **Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.**

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp., se caracteriza por fases de reproducción asexuada y sexuada dentro de la célula del hospedador (Figura I-12). El ciclo se inicia tras la ingesta del ooquiste infectante, el cual se desenquista liberando 4 esporozoitos móviles a través de una sutura localizada en la pared del ooquiste. Estos esporozoitos atacan e invaden la membrana apical de los enterocitos (u otras células del hospedador), transformándose en el primer estadio intracelular denominado trofozoíto. Mediante merogonia, los trofozoítos se transforman en merontes tipo I que contienen de 6 a 8 merozoitos en su interior. Los merozoitos tipo I, localizados en la luz del intestino tras la ruptura del meronte, invaden nuevas células del hospedador iniciando un ciclo de autoinfección en el hospedador mediante la producción de nuevos merontes tipo I, o bien, iniciar el ciclo sexual mediante su transformación a merontes tipo II que contienen en su interior 4 merozoitos. Tras la lisis de la célula hospedadora, los merozoitos tipo II liberados invaden nuevas células transformándose en macro-gametocito (gameto femenino) y micro-gametocito (gameto masculino). Este último, libera varios microgametos que fertilizarán los macro-gametocitos hasta la formación de cigotos que, mediante esporogonia, se transformarán en ooquistes de pared fina y de pared gruesa, responsables de la autoinfección y transmisión respectivamente (Barta & Thompson, 2006; Borowski *et al.*, 2008).

Cerca del 20% de los ooquistes, denominados ooquistes de pared fina, carecen de la doble membrana que conforma la pared del ooquiste y, al parecer, son los responsables de reiniciar la infección dentro del hospedador mediante la invasión de nuevos enterocitos. Por el contrario, el resto de los ooquistes (80%), denominados ooquistes de pared gruesa, presentan la doble membrana lo que confiere un mecanismo de defensa y resistencia a los esporozoitos ante las condiciones adversas medioambientales y por tanto serán las formas infectantes para los hospedadores (Current & Reese, 1986).

Los estadios intracelulares de *Cryptosporidium* spp. se localizan en el extremo apical, dentro de una vacuola parasitófora extra-citoplasmática, de las micro-vellosidades del epitelio gastrointestinal así como de las células del tracto respiratorio de un amplio rango de hospedadores (Current & García, 1991; Spano *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999).

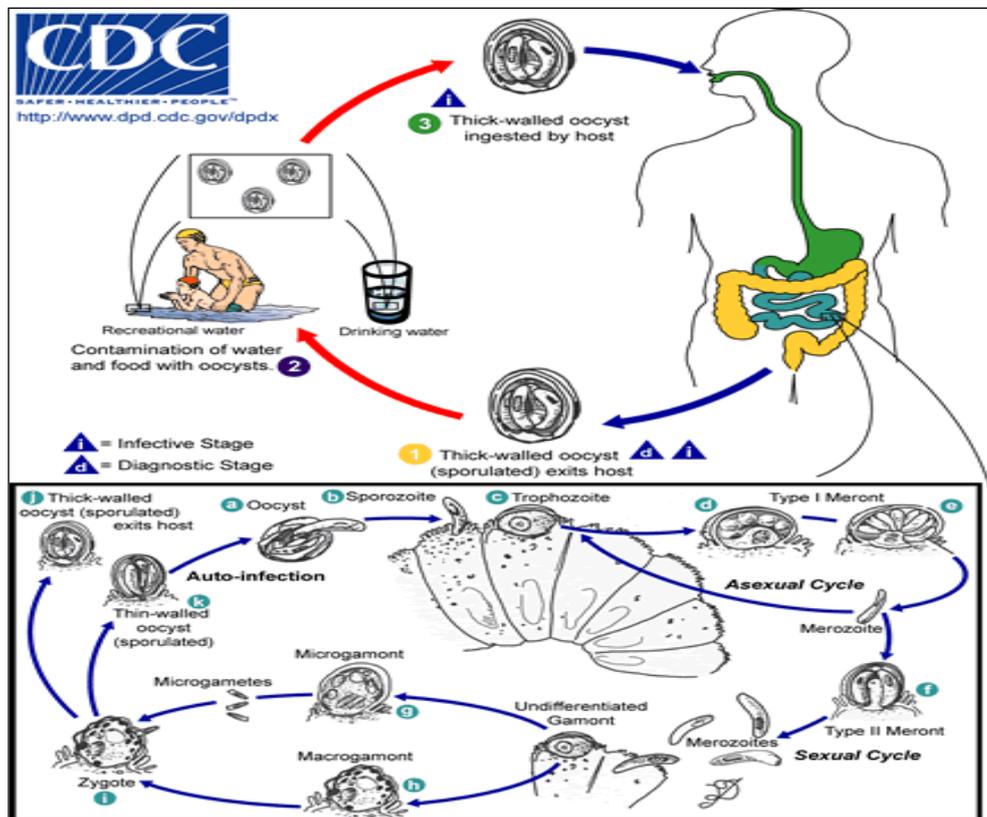


Figura I-12: Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Fuente: CDC

### ***Epidemiología de Cryptosporidium* spp.**

La prevalencia global de la criptosporidiosis en individuos infectados con el VIH, con o sin diarrea, no es del todo conocida (Chacín-Bonilla, 2008). Es menos frecuente en pacientes asintomáticos. Las tasas de infección en pacientes con diarrea han sido muy variadas, fluctuando de 0% a 100%, con un promedio de 32% (Hunter & Nichols, 2002).

En Guinea Ecuatorial la prevalencia fue del 3,9% en los pacientes VIH positivos (Fuentes *et al.*, 2007), y en estudio llevado a cabo por Blanco *et al.*, en 2009,

encontraron una proporción del 14,9% en la población VIH positiva de Malabo y en Bata el 20,3% (Blanco *et al.*, 2009).

La criptosporidiosis humana se ha detectado en todos los continentes en las zonas rurales y urbanas tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados. La prevalencia de la infección a nivel mundial varía de un lugar a otro, ya que está condicionada por diversos factores tales como el diseño del estudio, la población estudiada (edad, condición inmunológica, estado nutricional...), área geográfica, estacionalidad, virulencia del parásito, endemidad del parásito en la población y la sensibilidad de los métodos diagnósticos (Hunter & Nichols, 2002). Encontramos las siguientes prevalencias según estudios realizados en el mundo: en los EEUU se reportó una prevalencia total del 3,8% (Sorvillo *et al.*, 1994); en Europa del 6,6% (Pedersen *et al.*, 1996); y en países en vías de desarrollo hasta 60,5% (DeHovitz *et al.*, 1986; Moura *et al.*, 1989; Current & García, 1991; Chacín-Bonilla *et al.*, 2006; De la Parte-Pérez & Brito, 2004). Además de los factores de riesgo anteriormente citados, las condiciones higiénico-sanitarias deficientes favorecen la adquisición de *Cryptosporidium* spp., como ocurre en otras parasitosis intestinales.

Los pacientes infectados con el VIH tienen mayor riesgo de infección con *C. hominis* y *C. parvum* y son más propensos a otras especies de origen animal, tales como: *C. andersoni*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. baileyi*, *C. saurophyllum*, *C. suis* y *C. serpentis* (Pieniazek *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2000; Hunter & Nichols, 2002). La inmunodeficiencia de estos pacientes podría determinar una mayor susceptibilidad a estas especies, que generalmente no son infecciosas para los humanos. El riesgo aumenta con el estado de inmunosupresión y algunas conductas sexuales, tales como las prácticas homosexuales y la multiplicidad de parejas (Janoff & Reller, 1987; Pedersen *et al.*, 1996; Caputo *et al.*, 1999). La exposición a baños de sauna se ha asociado a una mayor seropositividad a la infección (Caccio & Pozio, 2006).

Los humanos adquieren la infección a través de la ruta feco-oral, mediante la transmisión directa o indirecta.

La transmisión directa tiene lugar a través de dos ciclos: Antroponótico: debido al contacto directo persona-persona (Hunter *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2006; Siwila *et al.*,

2007; Valderrama *et al.*, 2009) y Zoonótico: debido al contacto con animales, tanto de crianza como de compañía (Hunter *et al.*, 2007; Moghaddam, 2007). También se ha demostrado el papel de la mosca doméstica en la transmisión (Clavel *et al.*, 2002).

La aplicación de herramientas moleculares ha permitido identificar y diferenciar los aislamientos de origen antroponótico de los zoonóticos que circulan en los diferentes ambientes, aspectos de gran importancia para el conocimiento de los ciclos de transmisión, así como del potencial zoonótico del parásito (Morgan *et al.*, 1998).

Dentro del ciclo zoonótico, el ganado bovino es considerado la principal fuente de infección para el hombre. Los animales de compañía, así como los de vida silvestre, al parecer no representan una fuente importante de infección para el hombre (Xiao & Ryan, 2008), aunque pudieran representar un riesgo para ciertos grupos de individuos (Smith *et al.*, 2009).

La transmisión indirecta, puede tener lugar tras la ingesta de agua (de consumo o recreativos) y alimentos (principalmente frutas y verduras crudas) contaminados con ooquistes. El agua de consumo se ha identificado como la principal fuente de infección para el ser humano, reflejado por los brotes a nivel mundial, donde la infección ha sido asociada al consumo de agua potable contaminada con ooquistes de origen humano y animal (MacKenzie *et al.*, 1994; McLauchlin *et al.*, 2000; Valderrama *et al.*, 2009). Por otro lado, a través del contacto con aguas recreativas contaminadas con ooquistes (McLauchlin *et al.*, 2000; Valderrama *et al.*, 2009).

La criptosporidiosis humana, representada por casos esporádicos, se ha relacionado con el consumo de alimentos contaminados, particularmente frutas y verduras crudas o parcialmente procesadas (Ethelberg *et al.*, 2009; Pönka *et al.*, 2009). La inadecuada manipulación de los alimentos, el uso de estiércol como fertilizante del suelo, así como el uso de aguas residuales para el riego de los cultivos, son algunos de los factores que favorecen la contaminación de los alimentos con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Ethelberg *et al.*, 2009).



## **CAPÍTULO 2: *OBJETIVOS***



## ***OBJETIVOS***

---



## **2. OBJETIVOS**

Las enfermedades diarreicas son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países tropicales en desarrollo, siendo prioritario su control y prevención. Entre los países tropicales, Guinea Ecuatorial es zona endémica en numerosas parasitosis que vienen a agravar el estado de salud de las Personas que viven con el VIH (PVVIH), ya que las infecciones por parásitos son una causa frecuente de diarrea crónica en los pacientes más inmunodeprimidos.

La importancia de este estudio se justifica por los factores antes expuestos: la alta prevalencia de la infección por VIH, la falta de estudios de investigación sobre parásitos intestinales en pacientes infectados por el VIH en Guinea Ecuatorial, así como por tratarse de una zona endémica para otras enfermedades como son las enfermedades parasitarias que, en el caso de pacientes inmunodeprimidos, son difíciles de erradicar y contribuyen a empeorar la calidad de vida de quienes las padecen.

Por otra parte, en el contexto del estudio – Guinea Ecuatorial – las investigaciones realizadas son escasas y los tratamientos para muchas parasitosis intestinales se dispensan indiscriminadamente, sin poder diferenciar las especies patógenas de las que no lo son. Esto es debido a que los diagnósticos se llevan a cabo por técnicas microscópicas que en ocasiones no son capaces de diferenciar unas especies parasitarias de otras, siendo estas las únicas técnicas disponibles. Nuestro estudio constituye la investigación más extensa que se ha realizado en el país y profundiza además en la epidemiología molecular de algunas parasitosis intestinales como la amebiasis, criptosporidiosis y giardiosis.

Para su realización, se han planteado los siguientes objetivos:

## **2.1 Objetivo general**

Determinar la proporción de parásitos intestinales que se encuentran en la población VIH positiva de Guinea Ecuatorial, considerando las Regiones Continental e Insular (Isla de Bioko) del país y caracterizando genéticamente las especies y genotipos de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, *Cryptosporidium* y *Giardia* que se están diseminando actualmente entre estos pacientes. También se analiza la influencia de los factores sociodemográficos y clínicos de la población en la adquisición de las parasitosis intestinales, incluyendo como elemento de comparación una pequeña proporción de habitantes VIH negativos que convivan con los VIH positivos.

Este objetivo general, se concreta en los siguientes objetivos específicos:

## **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar la proporción de las parasitosis intestinales que afectan a pacientes infectados por el VIH con o sin SIDA en Guinea Ecuatorial.
- Definir las especies, genotipos y/o sub-genotipos de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, *Cryptosporidium* y *Giardia* que se diseminan entre los pacientes VIH positivos en Guinea Ecuatorial.
- Analizar las posibles asociaciones entre las especies y/o genotipos detectados con los datos sociodemográficos y clínicos de las personas participantes en el estudio; determinando a su vez la posible presencia de portadores sanos.
- Comparar los riesgos de adquisición de las infecciones parasitarias intestinales entre las personas VIH positivas y VIH negativas.

## **CAPÍTULO 3: *MATERIAL Y MÉTODOS***



## ***MATERIAL Y METODOS***

---



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MATERIAL**

#### **3.1 Pacientes y muestras**

##### **3.1.1 Muestreo y tamaño muestral**

La dimensión de la muestra se calculó teniendo en cuenta las personas infectadas con VIH/SIDA y controladas en las Unidades de Referencia de Enfermedades Infecciosas (UREIs) de Malabo y Bata y en el Centro de Tratamiento Ambulatorio (CTA) del Centro de Salud M<sup>a</sup> Rafols de Bata. En total, según los datos del Fondo Global 2009 para Guinea Ecuatorial, sumaban 1.219 pacientes. Conociendo el tamaño poblacional, el cálculo del tamaño de la muestra fue realizado con la ayuda del logístico Epidat v3.0, con una proporción esperada del 0,5, precisión absoluta del 0,04 y un nivel de confianza del 95,5%. De esta manera se estableció una muestra total de 415 personas VIH positivas. Teniendo en cuenta las posibles pérdidas o presencia de sesgos que supusieran la salida de pacientes del estudio, se añadió un 20,0% de la muestra seleccionada, resultando 498. Finalmente el número de personas VIH positivas estudiadas fue de 533 por lo que la precisión final resultó ser de 0,03256.

Conforme transcurría el proyecto y para poder determinar la influencia de factores ambientales en la prevalencia de enfermedades parasitarias intestinales, se seleccionó un pequeño grupo de 110 personas VIH negativas que vivían con personas VIH positivas, que además presentarían parásitos de transmisión de persona a persona.

##### **3.1.2 Recogida de la muestra y conservación**

De cada paciente se tomó una muestra de heces fecales. La recogida de muestras se realizó por muestreo consecutivo hasta alcanzar el tamaño muestral calculado. Las muestras de los pacientes procedentes de la Isla de Bioko se recogieron entre los meses de marzo y abril de 2010 y las de los pacientes de la Región Continental durante el mes de agosto de ese mismo año.

Las muestras fueron recogidas en frascos de heces de boca ancha, en el mismo momento y lugar en que se realizó la entrevista para obtener el resto de la información que requerían las variables del estudio. Se dieron las siguientes instrucciones para la recogida de la muestra: que fuera hecha directamente en el frasco, evitando que se mezclara con orina o cayera a la tierra o al suelo del inodoro. De esta manera se evitaba la contaminación de las heces con la orina, la tierra, etc.

Las muestras fueron trasladadas inmediatamente desde su lugar de recogida hasta el laboratorio en neveras portátiles y conservadas a 4° C – 8° C hasta el momento de su envasado y realización de las técnicas que requerían realizarse en las primeras 24 horas. De cada muestra se hicieron cuatro partes alícuotas, una para la inmunocromatografía rápida (ICR) y para la visión directa de las heces con solución salina y yodo. La segunda alícuota se introdujo en una solución comercial SAF formol-acético (REAL SAF, Valencia, España) para el posterior análisis microscópico de la concentración de las mismas. La tercera alícuota se almacenó en nevera a 4° C - 8° C y la cuarta se congeló a -20° C. La segunda, tercera y cuarta alícuotas fueron enviadas al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, España, para su posterior análisis, con las respectivas autorizaciones sanitarias para el envío de muestras biológicas (**Anexos 1-3**).

### **3.1.3 Definición de variables y recogida de datos**

#### *Información socio-demográfica y clínica*

De cada participante en el estudio, se recogieron los siguientes datos: edad, sexo, embarazo, niveles de formación académica, información higiénica y socioeconómica y lugar de residencia. También se les preguntó por su sintomatología intestinal (diarrea, estreñimiento y otros síntomas intestinales). En el caso de personas VIH positivas se añadió el valor de las células T-CD4+ del mismo día de la recogida de variables, tratamiento antirretroviral (TARV) y línea de tratamiento (**Anexo 4**).

**Definición de las variables:**

**Edad:** la edad de la persona en años. Se re-codificó en:

- Menor o igual a 14 años: niño.
- Mayor o igual a 15 años: adulto.

**Sexo:** mujer y varón.

**Nivel de formación:** Corresponde al nivel escolar medido como sigue:

- Nula: si la persona jamás fue a la escuela.
- Primaria: si fue a la escuela primaria terminándola o no (1° a 6° curso)
- ESBA (Enseñanza Secundaria Básica): corresponde a los siguientes cursos, de 1° a 5° de bachiller antiguo o de 1° a 4° de la ESBA).
- Bachiller: corresponde a 6° de bachiller y preuniversitario antiguo y/o 1° y 2° de bachillerato actual.
- F. P: Formación Profesional.
- Universitaria.

Por motivos de operatividad, dada la escasa frecuencia de alguna de las categorías mencionadas, para su tratamiento estadístico, esta variable se re-codificó en:

- Primaria y nula.
- Secundaria: en este grupo están los del nivel de ESBA y bachiller.
- Profesional: en este grupo están los del nivel de formación profesional y universitaria.

**Nivel de información higiénica:** El nivel de información higiénica se define como el conocimiento del participante sobre el conjunto de prácticas alcanzadas por una comunidad que se asocian a la protección de la vida, la salud o a las buenas prácticas, como el lavado de manos antes de comer o tocar alimentos, después del baño o de limpiar al niño, la higiene del cuerpo y del hogar; el uso adecuado del agua y el tratamiento de los alimentos. A todos los participantes se les preguntó sobre la manera de tratar las verduras, el agua para uso doméstico, la importancia de lavarse las manos... Se clasificó de la siguiente manera:

- Baja: cuando no practicaba ninguna medida higiénica con el agua de uso diario, ni conocía la importancia de lavar las verduras antes de guisarlas, lavar las frutas antes de comerlas, etc.
- Media: cuando practicaba alguna de las medidas.
- Alta: cuando practicaba las medidas básicas.

**Nivel socioeconómico:** Se refiere al poder adquisitivo de los participantes. Para definirlo, se tuvo en cuenta el tipo de actividad remunerada que realizaba y las posibilidades de abastecer sus necesidades básicas. Se clasificó en:

- Bajo: cuando dependía prácticamente de los demás.
- Medio: cuando podía satisfacer parte de sus necesidades básicas.
- Alto: cuando tenía posibilidades económicas para satisfacer todas sus necesidades y aún le quedaba dinero.

**Síntomas intestinales:** Se consideró que la persona presentaba síntomas cuando manifestaba alguna alteración intestinal. Se clasificaron en:

- Diarrea.
- Estreñimiento.
- Otros síntomas intestinales: dolor epigástrico, retortijones, aerofagia, etc.

**Residencia habitual:** Definido como el lugar donde vivía habitualmente. Se clasificó en:

- Rural.
- Urbano.
- Cinturón urbano.

**Valor del recuento de las células T-CD4+:** El recuento de las células T-CD4+ se hace de rutina en la revisión de las personas que viven con el VIH (PVVIH) para conocer su estado inmunológico. Se les practicaba una extracción de sangre en tubo con EDTA y recuento de células con citómetro de la marca CyFlow® Counter de Partec. Este valor constituye uno de los factores decisivos para iniciar tratamiento antirretroviral y/o profilaxis de infecciones oportunistas (IO) y es el mejor indicador de la progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes (Mellors *et al.*, 1997; Egger *et al.*, 2002).

El estado inmunológico de los pacientes se clasificó siguiendo los criterios de la OMS (WHO, 2007):

- No-inmunosupresión:  $>500$  cél/mm<sup>3</sup> de sangre.
- Inmunosupresión moderada: 350-499 cél/mm<sup>3</sup> de sangre.
- Inmunosupresión avanzada: 200-349 cél/mm<sup>3</sup> de sangre.
- Inmunosupresión severa  $<200$  cél/mm<sup>3</sup> de sangre.



**Figura MM-1:** Citómetro del Laboratorio de microbiología del Hospital Regional de Bata.

### **Tratamiento antirretroviral (TARV)**

Las recomendaciones para iniciar los tratamientos ARV en los países con importantes recursos destinados a sanidad, se basan en criterios clínicos, inmunológicos y virológicos. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, la OMS recomienda adoptar, si hay disponibilidad, sólo criterios clínicos e inmunológicos, debido a los elevados costes y la dificultad de realizar algunas pruebas como la determinación de la carga viral. En Guinea Ecuatorial, cualquier paciente diagnosticado de infección por VIH cuya cifra de las células T-CD4<sup>+</sup> sea  $\leq 350$  cél/mm<sup>3</sup>, independientemente de su situación clínica, inicia TARV (MINSABS, 2010).

Los protocolos de tratamientos se dividen en: primera línea, que comprende los esquemas I, II, III y IV (Tabla MM-1), para personas que nunca han sido tratadas y

deben iniciar el tratamiento; y la segunda línea o de rescate, que corresponde a los esquemas V y VI, reservada a los pacientes que han respondido mal a los primeros esquemas o a aquellos que tienen contraindicaciones para el uso de los fármacos de primera línea.

**Tabla MM-1:** Esquemas del tratamiento antirretroviral.

<b>ESQUEMA TERAPÉUTICO</b>	<b>FÁRMACOS / MG.</b>	<b>PRESENTACIÓN</b>
<b>I</b>	Lamivudina (3TC) / 150 Estavudina (D4T) / 30-40 Nevirapina (NVP) / 200	Triamine 30/40
<b>II</b>	Lamivudina (3TC) / 150 Estavudina (D4T) / 30-40 Efavirenz (EFV) / 600	
<b>III</b>	Lamivudina (3TC) / 150 Zidovudina (AZT) / 300 Nevirapina (NVP) / 200	Duovir
<b>IV</b>	Lamivudina (3TC) / 150 Zidovudina (AZT) / 300 Efavirenz (EFV) / 600	
<b>V</b>	Zidovudina (AZT) / 300 Didanosina (DDI) / 100 Lopinavir (LPV)/ 133,3 Ritonavir (RTV) / 33,3	
<b>VI</b>	Zidovudina (AZT) / 300 Didanosina (DDI) / 100 Indinavir (INV) / 400 Ritonavir (RTV) / 33,3	

### **Tratamiento antirretroviral en niños**

La OMS no recomienda iniciar el tratamiento antirretroviral en niños menores de 18 meses de edad, hijos de madres seropositivas, si no se dispone del recuento de las células T-CD4+. Los esquemas recomendados coinciden con los esquemas III y IV ya descritos anteriormente usando la nevirapina (NVP) y no el efavirenz (EFV) en los menores de 3 años o que pesen menos de 10 kg. En caso de fallo terapéutico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda como esquema de rescate o de segunda línea el ddI + d4T + nelfinavir (NFV) o lopinavir/ritonavir (LPV/RTV). Es preferible el Kaletra® de Abbott (LPV/RTV) al NFV porque no hay que partir los comprimidos, tiene mejor sabor, son menos dosis, se presenta en jarabe y es más

potente (Guía de práctica clínica, MINSABS, 2010). El inconveniente es que precisa de cadena de frío.

Otro problema con los niños, es que no pueden ser recomendadas las combinaciones de dosis fijas de genéricos, debido a que hay que ajustar las dosis de cada antirretroviral según el peso, y las combinaciones de dosis fijas no prevén este aspecto.

### **Tratamiento antirretroviral en embarazadas**

El tratamiento ARV durante la gestación, en el parto, e incluso en algunos casos, durante la lactancia, es fundamental para disminuir la carga viral materna (Protocolo PTMH, MINSABS 2009). Además, el TARV disminuye el riesgo de transmisión vertical, incluso cuando la carga viral plasmática materna es indetectable (Arendt *et al.*, 2007; Kilewo *et al.*, 2009).

Las indicaciones para iniciar TARV de gran actividad (TARGA) durante la gestación se basan en la evaluación clínica de la gestante y el recuento de células T-CD4+, según recomendaciones de la OMS (WHO, 2006). Cuando una gestante precisa TARGA, el tratamiento debe iniciarse tan pronto como sea posible, incluso en el primer trimestre de la gestación, continuando durante el parto y post-parto. La combinación recomendada es AZT+3TC que, demostrada su seguridad y eficacia, constituye la asociación de primera elección (WHO, 2006). Se debe instaurar además, profilaxis con cotrimoxazol (Guía de práctica clínica, MINSAMBS, 2010).

Se aconseja no dar lactancia materna. Tras el parto, se recomienda tratar al recién nacido como un expuesto, usando la NVP dosis única y AZT durante 7 días. La serología, por el método ELISA, a los 18 meses confirma el resultado definitivo del niño, excepto si una serología previa es negativa. Todo niño nacido de madre seropositiva debería iniciar siempre la profilaxis con cotrimoxazol hasta que se demuestre su negatividad o sus defensas elevadas (Guía terapéutica práctica, MINSABS, 2009).

### **3.1.4 Muestras de la población objeto del estudio**

#### ***Pacientes VIH positivos***

Se estudiaron 533 muestras de heces procedentes de pacientes sintomáticos y asintomáticos infectados con el VIH, que acuden a las UREIs y CTAs para su seguimiento habitual.

Una persona se considera VIH positiva, cuando al realizar las pruebas inmunológicas presenta anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana. La estrategia de diagnóstico recomendada por la OMS para Guinea Ecuatorial es la III, que comprende la realización de 3 test rápidos diferentes de forma seriada (Protocolo diagnóstico, 2009).

Se sospecha que un paciente está en estado de SIDA cuando presenta una pérdida de peso de más del 10% y algún signo mayor o menor en ausencia de alguna causa conocida de inmunosupresión como cáncer o malnutrición severa (Guía terapéutica práctica, 2010).

#### **Signos Mayores:**

- Pérdida de peso del 10% del total corporal.
- Fiebre prolongada de más de un mes de evolución.
- Diarrea de más de un mes de evolución.

#### **Signos Menores:**

- Tos persistente durante más de un mes.
- Dermatitis pruriginosa o enrojecimiento de la piel durante más de un mes.
- Historia de Herpes zoster.
- Candidiasis bucofaríngea.
- Infección por herpes simple diseminada o progresiva crónica.
- Sudores nocturnos.
- Demencia (confusión, dificultades para la concentración, pérdida de memoria, desorientación).

- Dolores de cuerpo crónicos o debilidad y fatiga (sentirse muy cansado incluso cuando la persona no ha hecho un ejercicio duro).
- Ganglios linfáticos persistentes y generalizados.

Los pacientes fueron incorporados al estudio cuando acudían a la cita de seguimiento habitual tras su conformidad informada y firmada, hasta alcanzar el número total de participantes para el estudio.

## **MÉTODOS**

### **3.2 Identificación de parásitos por observación microscópica**

Se realizó un diagnóstico coproparasitológico inicial in situ, con muestras de heces recién emitidas, por observación microscópica de una suspensión de las mismas en suero fisiológico y otra en lugol. Además, las alícuotas conservadas en SAF se concentraron por el método de formol-acetato de etilo para detectar la presencia de parásitos. Después de la concentración se hicieron frotis de todas las muestras y se realizó una tinción Zielh Neelsen modificada para detectar ooquistes de coccidios (Henriksen y Pohlenz, 1981).

#### **3.2.1 Técnica microscópica con suero fisiológico y lugol**

Se deposita en un portaobjetos una gota de suero fisiológico y en otro una gota de lugol. En ambos casos, las dos gotas se mezclan con una pequeña porción de muestra de heces y se cubren con un cubreobjetos, se observan al microscopio con objetivos de 10x, 40x y 100x. A las muestras procedentes de la concentración no se las añade solución de lugol.

Las concentraciones del suero fisiológico y del lugol son las siguientes:

- *Solución salina:*

NaCl	7,5 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

- *Solución de lugol:*

Yodo en cristales	10 g
Yoduro de potasio	20 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

### **3.2.2 Técnica de concentración de heces**

Se realizó para la detección de formas parasitarias en todas las muestras. Esta técnica se realiza en el Laboratorio de Parasitología de Zaragoza, ya que en Guinea Ecuatorial no disponemos de los medios necesarios. Esta técnica nos ha permitido comparar el resultado que hemos obtenido de las muestras concentradas y sin concentrar, sirviendo en parte para valorar los diagnósticos que se realizan habitualmente en el país.

Se procedió a la concentración de las muestras de heces mediante la técnica físico-química de formol-acetato de etilo, que aprovecha la mayor solubilidad de los restos fecales en acetato de etilo, menos denso que la solución de formalina-ácido acético, de manera que se eliminan las grasas y se depositan los parásitos junto con otros elementos no lipídicos. La técnica consiste en:

La muestra se resuspende en medio SAF, se homogeniza bien, agitando enérgicamente y se deja actuar durante media hora como mínimo.

Con la ayuda de un vortex se agita el tubo de SAF que contiene la muestra, después, se filtra para eliminar las partículas más groseras, pasando la suspensión a un tubo cónico de 18 ml.

Se añaden a la muestra 2 ml de acetato de etilo al 99,5% (88,10 Molar) y tras agitar el tubo bien, hasta que la mezcla parezca homogénea, se centrifuga a 500 x g durante 10 minutos. Con la centrifugación se separan dos fases: una superior que contiene los elementos grasos, otra, formada por una solución acuosa de formalina-ácido acético con partículas ligeras en suspensión. Se aprecian también una interfase con elementos ligeros y desnaturalizados y un sedimento, en el que se encuentran las formas parasitarias.

Se decanta el sobrenadante y se coloca una gota del sedimento en un portaobjetos para observarlo al microscopio. Con otra gota se realiza un frotis en un portaobjetos para su posterior tinción, que nos permita la observación de ooquistes de coccidios.

Composición de la formalina –ácido acético– acetato de sodio (SAF):

Formaldehído	1,6%
Alcohol Isopropílico Anhidro	7,45%
Ácido Acético	2,14%
Acetato Sódico	1,53%
H <sub>2</sub> O destilada	1 litro

### **3.2.3 Tinción ácido alcohol resistente de Ziehl-Neelsen modificado (ZNm)**

Una gota de muestra procedente de la concentración con formol-acetato de etilo fue depositada en un portaobjeto describiendo un círculo no muy grande. Se dejó secar durante un día.

Para su fijación, la preparación fue cubierta con metanol que se dejó secar completamente.

Tras la fijación, la muestra se cubrió con un trozo de papel de filtro, luego se cubrió con el colorante carbol fucsina durante 20 minutos y tras retirar con cuidado el papel, se lavó con agua.

Luego, la muestra fue decolorada con ácido sulfúrico al 7% durante 1 minuto y se lavó con agua.

Después del lavado, la muestra se cubrió con azul de metileno durante 1 minuto, se lavó y se dejó secar al aire en posición vertical.

La identificación de los ooquistes en las muestras teñidas se realizó en el microscopio con los objetivo de 40x y 100x.

### **3.3 Técnica de detección de antígenos por inmunocromatografía rápida (ICR)**

Se realizó la técnica de ensayo cualitativa de inmunocromatografía rápida para la detección rápida y simultánea de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y *Entamoeba histolytica* (Operon® SA, Zaragoza, España) en muestras de heces frescas, siguiendo las instrucciones del fabricante, dentro de las primeras 24 horas después de la recogida de la muestra.

El test Triple o Stick *Crypto/Giardia/Entamoeba* utiliza anticuerpos monoclonales específicos frente a *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* que detectan todas las formas del ciclo vital de los parásitos.

#### **Realización de la técnica:**

50 mg. de muestras sólidas y/o 100 µl de muestras líquidas o semisólidas fueron depositadas en un tubo de ensayo de 1,5 ml. que contenía 1 ml de solución de tampón de carga.

Una vez homogeneizada la mezcla, agitándola vigorosamente con la ayuda de un vortex, se centrifugó durante un minuto a 3.000 rpm para clarificar la muestra y así el sobrenadante estuviera libre de partículas sólidas en suspensión.

Tras la centrifugación, 150 µl del sobrenadante fueron transferidos a un tubo de ensayo y se procedió a introducir una tira de inmunocromatografía que tras 10 minutos de inmersión, fue retirada y leída: a) muestra negativa: línea morada (banda de control del test); b) muestra positiva a *Cryptosporidium parvum*: línea morada + línea azul; c) muestra positiva a *Giardia duodenalis*: línea morada + línea roja/rosa; d) muestra positiva a *Entamoeba histolytica*: línea morada + línea verde.

### **3.4 Técnicas de biología molecular**

Se llevaron a cabo técnicas de biología molecular para la diferenciación de especies y genotipado de algunos parásitos: *Entamoeba* spp., *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. La técnica utilizada fue la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) consistente en una amplificación específica de ácidos nucleicos.

La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático que permite amplificar *in vitro*, de forma exponencial, un fragmento específico de ADN localizado entre dos regiones de secuencia conocida, pudiéndose obtener numerosas copias del mismo.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se necesita un ADN diana de doble cadena, dos oligonucleótidos o iniciadores específicos (cebadores o “*primers*”) para el fragmento que se quiere amplificar, la enzima de polimerización (*Taq* polimerasa), la mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para producir nuevo ADN y un medio tamponado con  $Mg^{2+}$  como ión fundamental, que proporcione las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica.

Es un proceso que se lleva a cabo cíclicamente en un termociclador, estando cada ciclo dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización (separación de las dos cadenas de ADN), acoplamiento (unión de los cebadores con las secuencias diana) y polimerización (síntesis de la cadena complementaria a partir de los cebadores).

#### **3.4.1 Extracción de ADN**

Se procesaron muestras de heces congeladas a  $-22^{\circ} C$  sin conservantes para *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba* spp.

En el caso de *Giardia* spp., es preciso un pre-tratamiento, por lo que antes de iniciar la extracción de ADN de las muestras positivas por inmunocromatografía rápida y por microscopía fueron sometidas a la técnica de concentración de quistes con sacarosa y/o la lisis de quistes con choques térmicos a partir de muestras conservadas a  $4^{\circ} C$ .

### ***Concentración de quistes de Giardia spp. con gradiente de sacarosa:***

Se resuspende una pequeña porción de heces en 5 ml de agua esterilizada.

Para cada muestra se toman dos tubos falcón y se ponen 10 ml de sacarosa 1M, se añade la suspensión anterior sobre la sacarosa hasta un volumen total de 15 ml, con cuidado de no mezclarlas, deslizando la muestra por la pared del tubo. Se centrifuga a 1.500 rpm durante 6 minutos.

Se recoge el sobrenadante junto con el menisco con una pipeta pasteur y se pasa a otro tubo falcón, añadiendo agua esterilizada hasta un volumen total de 40 ml. Se agita bien y se centrifuga a 1.500 rpm durante 6 minutos.

Se desecha el sobrenadante. Se añaden al sedimento 2,5ml de agua esterilizada y se resuspende.

En otros dos tubos se ponen 10 ml de sacarosa 0,5 M, añadiendo la muestra igual que en el caso anterior. Se centrifuga a 1.500 rpm durante 6 minutos.

Con la ayuda de una pipeta pasteur se recoge el sedimento, alrededor de 1 ml, y se pasa a un tubo limpio. Se añade agua esterilizada hasta un volumen total de 40 ml, agitando bien. Se centrifuga a 5.300 rpm durante 10 minutos.

Se desecha el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1 ml de agua destilada estéril. Se pasa a un eppendorf y se conserva a -20° C hasta que se realice la extracción de ADN. Tomamos una pequeña gota para observarlo al microscopio con objetivo de 40x para comprobar la presencia de quistes de *Giardia* spp.

### ***Lisis de quistes de Giardia duodenalis por choques térmicos:***

200 mg de heces o 200 ml de concentrado de quistes de *Giardia* se sometieron a cuatro ciclos de choques térmicos, consistentes en introducir la muestra de heces al baño maría a 100° C durante 10 minutos y posteriormente en el congelador a -20° C durante 30 minutos.

### ***Extracción de ADN con el kit comercial IBIAN® DNA Stool Kit***

El protocolo de trabajo fue realizado según la pauta indicada por la casa comercial IBIAN®.

En un tubo eppendorf se colocaron 200 mg de heces sólidas o 200 µl de heces líquidas, se les añadió 1,2 ml de IBIAN lysis Buffer. Tras homogeneizar la muestra con vortex durante 1 minuto, se incubó 10 minutos a 95° C, agitando seguidamente durante unos segundos con vortex y centrifugando a 13.300 rpm durante 1 minuto.

El sobrenadante fue transferido al tubo de IBIAN Inhibitor Remove para el proceso de absorción de sustancias inhibitoras presentes en la muestra. La muestra fue homogeneizada con vortex durante 15 segundos, incubada a temperatura ambiente 1 minuto y centrifugada a 13.300 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 13.300 rpm durante 3 minutos.

Una alícuota de 400 µl se añadió a un tubo de eppendorf de 1,5 ml que contenía 25 µl de Proteinasa K, se homogeneizó utilizando vortex y se incubó a 70° C durante 10 minutos. Posteriormente se le añadieron 400 µl de IBIAN Binding Buffer, se homogeneizó y el lisado fue transferido a una columna de filtrado dispuesta sobre un tubo recolector de 2,0 ml.

La columna se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto, el líquido recogido en el tubo fue desechado y se procedió a dos lavados con 500 µl y 800 µl de IBIAN Wash Buffer I y II, respectivamente, mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 1 minuto. Para asegurar la eliminación de todo el etanol de los lavados se centrifugó la columna a 13.300 rpm durante 3 minutos.

Para la recuperación del ADN, la columna fue depositada en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le añadieron 200 µl de IBIAN Elution Buffer. Después de incubar a 70° C durante 3 minutos, se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto y el ADN se conservó a -20° C hasta su uso.

### **3.4.2 Técnicas moleculares para la detección de *Entamoeba* spp.**

La diferenciación entre *E. dispar* y *E. histolytica* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gutiérrez-Cisneros *et al.* en 2009 y para *E. moshkovskii* el descrito por Ali *et al.* en 2003, con pequeñas modificaciones.

El ADN control para *E. moshkovskii* fue cedido por el Dr. Graham Clark (The London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres, Inglaterra).

Se desarrolló una *nested*-PCR, ya que este tipo de reacción permite un incremento de la sensibilidad al contar con dos pasos de amplificación, y de la especificidad al utilizar dos parejas de cebadores distintos en cada paso de amplificación.

#### ***Técnica molecular para la detección de E. histolytica y E. dispar***

Para la PCR, se utilizaron cebadores diseñados por Evangelopoulos *et al.* (2000) y por Paglia &Visca (2004).

En la primera PCR se utilizaron los cebadores E1 y E2 que permiten amplificar un fragmento genérico para *E. histolytica* y *E. dispar* de 1076 pb (Tabla MM-2). En un segundo paso, con este producto se llevó a cabo la segunda reacción de PCR con los cebadores Eh-l y Eh-r específicos para *E. histolytica* obteniendo un producto de amplificación final de 427 pb y los cebadores Ed-1 y Ed-r específicos para *E. dispar*, obteniendo un producto final amplificado de 195 pb (Tabla MM-2).

La reacción para la primera PCR se desarrolló en un volumen final de 50 µl empleando 5 µl de ADN, 5 µl de buffer 10X ([100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl] (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 0,4 µl de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 25 µM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) (Promega Corporation, USA); 1 µl de cada cebador de 12,5 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands ), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A) y 36,1 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización a 95 ° C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 ° C durante 50 segundos, 50 ° C durante 90 segundos y 72 ° C durante 120 segundos, seguido de una extensión final a 72 ° C durante 7 minutos.

La reacción para la segunda PCR se desarrolló en dos tubos eppendorf diferentes, uno para *E. histolytica* y otro para *E. dispar*; con un volumen final en cada uno de 50 µl, empleando las mismas cantidades y concentración de reactivos, así como de los diferentes cebadores para preparar el Master-Mix, utilizadas en el procedimiento de la primera PCR. Como ADN se utiliza el producto de la primera PCR. También las condiciones de amplificación de la segunda reacción de PCR fueron las mismas de la primera reacción, excepto en la temperatura de alineación que fue de 58° C.

### ***Técnica molecular para la detección de E. moshkovskii***

Para la detección de *E. moshkovskii*, se utilizaron cebadores diseñados por Ali *et al.* (2003).

En la primera PCR, los cebadores R-R5 y R-R3 permiten amplificar un fragmento de ADN de 323 pb (Tabla MM-2). Posteriormente, con este producto se llevó a cabo la segunda reacción de PCR con los cebadores EmR-1 y EmR-2 específicos para *E. moshkovskii* obteniendo un producto de amplificación final de 260 pb (Tabla MM-2).

La reacción para la primera PCR se desarrolló en un volumen final de 25 µl empleando 2,5 µl de ADN, 2,5 µl de buffer 10X ([100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl] (BIOTOOLS B&M Labs, S.A); 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 0,25 µl dNTPs 25 µM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) (Promega Corporation, USA); 2,5 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 14 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en: un paso previo de desnaturalización a 94 ° C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 ° C durante 60 segundos, 55 ° C durante 90 segundos y 72 ° C durante 120 segundos, seguido de una extensión final a 72 ° C durante 5 minutos.

La reacción para la segunda PCR se desarrolló en un volumen final de 50 µl empleando 5 µl de ADN de la primera PCR, 5 µl de buffer 10X, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µl de dNTPs 25 µM; 5 µl de cada cebador 10 µM, 0,3 µl de Taq polimerasa y 32 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación de la segunda reacción de PCR fueron las mismas que se describen para la primera reacción de PCR.

**Tabla MM-2.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *SSUrDNA*

Gen	Cebadores	Secuencia de 5' a 3'	Pares de base	Referencia
<i>SSUrDNA</i>	E1 E2	TGCTGTGATTAACGCT TTAACTATTTCAATCTCGG	1076	Evangelopoulos <i>et al.</i> , 2000.
	Eh-1 Eh-r	ACATTTTGAAGACTTTATGTAAGT A CAGATCTGAAAACAATGCTTCTCT	427	
	Ed-1 Ed-r	GTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAA ACACCACTTACTATCCCTACC	195	Paglia &Visca, 2004
	R-R5 R-R3	AGCATCAGCCTTCTAAGCTG CTTCCGACTGAGCTAACAAAG	323	Ali <i>et al.</i> , 2003
	EmR-1 EmR-2	GGCGCCTTTTTTACTTTATGG GCTAACAAGGCCAATCGATAA A	260	

### 3.4.3 Técnicas moleculares para la detección de *Cryptosporidium* spp.

#### ***PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism)***

La técnica se utiliza con el fin de identificar las especies y genotipos de *Cryptosporidium* presentes en Guinea Ecuatorial (Xiao *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2007). Para todas las muestras positivas por ICR y/o por tinción de ZNm se procedió a realizar la técnica de PCR anidada que amplifica el gen de la subunidad 18S del rRNA (*SSUrRNA*) del ARN ribosomal. En la primera PCR se obtuvo un producto de 1325 pb utilizando los cebadores Ssu1 y Ssu2, y en la segunda reacción de PCR, con los cebadores Ssu3 y Ssu4, se obtuvo un amplificado de 826-864 pb, dependiendo de la especie (Tabla MM-3).

La reacción para la primera PCR se desarrolló en un volumen final de 25 µl utilizando 2 µl de ADN, 2,5 µl de buffer 10X ([100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl] (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A); 0,2 µl de dNTPs 25 µM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) (Promega Corporation, USA); 0,25 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 18,8 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización a 94 ° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 45 segundos, 55 ° C durante 45 segundos y 72 ° C durante 60 segundos, y de una extensión final a 72 ° C durante 7 minutos.

La reacción para la segunda PCR se desarrolló en un volumen final de 50 µl empleando 3 µl de ADN de la primera PCR, 5 µl de buffer 10X, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,4 µl de dNTPs 25 µM; 0,5 µl de cada cebador 1 µM, 0,3 µl de Taq polimerasa y 39,1 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación de la segunda reacción de PCR fueron las mismas que se describen en la primera reacción de PCR.

**Tabla MM-3.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *SSUrRNA*

Gen	Cebador	Secuencia de 5' a 3'	Pares de base	Referencia
<i>SSUrRNA</i>	Ssu1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325	Xiao <i>et al.</i> , 1999
	Ssu2	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA		
	Ssu3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	826-864	
	Ssu4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		

#### ***Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)***

Para diferenciar algunas especies de *Cryptosporidium*, con las muestras de la segunda PCR en las que se obtuvo una amplificación del tamaño esperado, se realizó un análisis de polimorfismos de los fragmentos con las endonucleasas *SspI* de 10 u/µl y *VspI* 12 u/µl (Promega Corporation, USA) (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 1999), para ello, se realizó la digestión de 3 µl del producto de la segunda PCR con 1 µl de cada una de las enzimas de restricción en tubos separados, 2 µl del tampón de reacción 10X de la enzima correspondiente en cada caso y 14 µl de agua destilada estéril; con un volumen total de 20 µl. La mezcla fue incubada a 37° C durante 24 horas, tras lo cual, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% tiñendo con bromuro de etidio para su posterior visualización.

#### ***Técnica de nested-PCR del gen gp60.***

Para determinar las familias y los subtipos de todos los aislados identificados como *C. parvum* y *C. hominis* se amplificó y estudió un fragmento del gen *gp60* que codifica la glicoproteína GP60 de 60 KDa presente en la superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium*, cuya función se encuentra implicada en la adhesión del mismo a la célula hospedadora (Strong *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003).

Para el desarrollo de la técnica se siguió el protocolo descrito por Glaberman *et al.* (2002) con algunas modificaciones. El fragmento del gen *gp60* (800-850pb) fue amplificado por una PCR anidada, con las siguientes reacciones:

En la primera PCR se utilizaron los cebadores AL3531 y AL3535 (Tabla MM-4), la reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl, con 3 µl de ADN, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOLS B&M Labs, S.A), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain), 0,5 µl de dNTPs 25 mM (Promega Corporation, USA), 1 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 36,5 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización de 95° C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 ° C durante 45 segundos, 52 ° C durante 45 segundos y 72 ° C 60 segundos, con una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

En la segunda PCR se utilizaron los cebadores AL3532 y AL3534 (Tabla MM-4), la reacción de amplificación se realizó en las mismas condiciones de la primera PCR, así como la mezcla de reacción. Se utilizó la muestra procedente de la primera PCR.

**Tabla MM-4.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *gp60*

Gen	Cebador	Secuencia de 5' a 3'	Pares de bases	Referencia
<i>gp60</i>	AL3531	ATAGTCTCCGCTGTATTC	980-1000	Alves <i>et al.</i> , 2003
	AL3535	GGAAGGAACGATGTATCT		
	AL3532	TCCGCTGTATTCTCAGCC	800-850	
	AL3534	GCAGAGGAACCAGCATC		

#### 3.4.4 Técnicas moleculares para la detección y genotipado de *Giardia* spp.

Para el genotipado de *Giardia* se realizó un análisis multilocus, amplificando por técnicas de PCR fragmentos del gen *tpi* y de la *β-giardina*. Para la amplificación del gen *tpi* se realizaron dos técnicas de PCR diferentes, que se detallan a continuación.

## Genotipado de *Giardia duodenalis* mediante PCR-RFLP del gen *tpi*.

### Detección de genotipos A y B

Para clasificar los distintos genotipos humanos de *Giardia duodenalis* se realizó una doble reacción en cadena de la polimerasa (PCR anidada), que amplifica un fragmento del gen de la triosafosfatoisomerasa (*tpi*), que permite diferenciar los distintos genotipos, linajes o grupos genéticos que afectan al hombre el A y B.

Los cebadores utilizados para genotipar *Giardia duodenalis* gen *tpi*, fueron los diseñados por Amar y colaboradores (Amar *et al.*, 2002) con alguna modificación (Tabla MM-5).

**Tabla MM-5.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *tpi*

Gen	Cebadores	Secuencia de 5' a 3'	Pares de base	Referencia
<i>tpi</i>	<b>Genotipo A</b>			Amar <i>et al.</i> , 2002
	TPIAF ( <i>tpi</i> genotipo A forward)	CGAGACAAGTGTGAGATGC	550	
	TPIAR ( <i>tpi</i> genotipo A reverse)	GTCAAGAGCTTACAACACG		
	TPIAIF ( <i>tpi</i> genotipo A inner forward)	CCAAGAAGGCTAAGCGTGC		
	<b>Genotipo B</b>			
	TPIBF ( <i>tpi</i> genotipo B forward)	GTTGCTCCCTCCTTTGTGC	140	
TPIBR ( <i>tpi</i> genotipo B reverse)	CTCTGCTCATTGGTCTCGC			
TPIBIF ( <i>tpi</i> genotipo B inner forward)	GCACAGAACGTGTATCTGG			

La reacción para la primera PCR, se realizó por separado con dos parejas de cebadores para cada genotipo: para el genotipo A se utilizaron los cebadores TPIAF-TPIAR y para el genotipo B los cebadores TPIBF-TPIBR, obteniendo un fragmento del gen *tpi* de 576 pb para el genotipo A y de 208 pb para el B.

La reacción se desarrolló en dos tubos de reacción por separado y de manera simultánea en un volumen final de 25 µl empleando 5µl de ADN, 2,5 µl de buffer 10X ([100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl] (BIOTOOLS B&M Labs, S.A); 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 0,25 µl de dNTPs 25 µM (Promega Corporation, USA); 0,75 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 14,75 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación

consistieron en un paso previo de desnaturalización a 94 ° C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 52 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

La reacción para la segunda PCR se desarrolló de la misma manera que la primera, utilizando los cebadores TPIAIF- TPIAR para el genotipo A y TPIBIF-TPIBR para el genotipo B, obteniendo un fragmento de 550 pb para el genotipo A y 140 pb para el B.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, empleando 2 µl de ADN de la primera PCR, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOLS B&M Labs, S.A), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain); 0,5 µl de dNTPs 25 µM (Promega Corporation, USA); 5 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 31 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización a 94 ° C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 20 segundos, 52 ° C durante 20 segundos y 72 ° C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

### ***Amplificación de un fragmento de 530 pb del gen tpi de Giardia***

Teniendo en cuenta el potencial zoonótico de *Giardia duodenalis* y la diversidad genética de este parásito, ya apreciada por otros autores al caracterizar el gen *tpi* (Ey *et al.*, 1993; Baruch *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1999), se llevó a cabo la técnica de PCR desarrollada por Sulaiman (Sulaiman *et al.*, 2003) que utiliza los cebadores que se muestran en la Tabla MM-6.

En la primera PCR se utilizaron los cebadores AL3543 y AL3546, obteniendo un producto final de 605 pb. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, con 5 µl de ADN, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOLS B&M Labs, S.A), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain), 0,4 µl de dNTPs 25 mM (Promega Corporation, USA), 2 µl de cada cebador 5 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,3 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 32,6 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, seguido

de 35 ciclos con la siguiente secuencia: 94 ° C durante 45 segundos, 50 ° C durante 45 segundos y 72 ° C, 60 segundos, con una extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

En la segunda PCR se utilizaron los cebadores AL3544 y AL3545, obteniendo un producto final de 530 pb. La reacción de amplificación y la mezcla de reacción se realizaron en las mismas condiciones de la primera PCR. Como ADN diana, se utilizaron 2,5 µl de muestra procedente de la primera PCR.

**Tabla MM-6.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *tpi-Sulaiman*

Gen	Cebador	Secuencia de 5' a 3'	Pares de base	Referencia
<i>tpi-sulaiman</i>	AL3543	AAATIATGCCTGCTCGTTCG	605	Sulaiman <i>et al.</i> , 2003
	AL3546	CAAACCTTITCCGCAAACC		
	AL3544	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT	530	
	AL3545	GTGGCCACCACICCCGTGCC		

### **PCR-RFLP para *Giardia duodenalis* del gen $\beta$ -giardina**

La amplificación del gen  $\beta$ -*giardina* se realizó mediante un protocolo de PCR anidada. En la primera reacción de PCR se utilizaron dos cebadores G7 directo y el cebador G759 reverso con una amplificación final de 753 pb, descrito y diseñado por Caccio *et al.* (2002) (Tabla MM-7). En la segunda reacción de PCR, los cebadores utilizados fueron los G1 y G2 diseñados por Lalle *et al.* (2004) que producen una amplificación final de 511 pb (Tabla MM-7).

En la primera PCR, la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, con 3 µl de ADN, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOLS B&M Labs, S.A), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain), 0,4 µl de dNTPs 25 mM (Promega Corporation, USA), 2 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,5 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 36,1 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en, un paso previo de desnaturalización a 95° C durante 15 minutos, tras el cual, y antes de comenzar los ciclos, se añadió la Taq polimerasa; seguido de 35 ciclos en las siguientes condiciones: 95 ° C durante 30 segundos, 65 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 60 segundos, con una extensión final a 72 ° C durante 7 minutos.

En la segunda PCR, la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, con 2 µl de ADN de la primera reacción, 5 µl de buffer 10X (BIOTOOLS B&M Labs, S.A), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain), 0,4 µl de dNTPs 25 mM (Promega Corporation, USA), 2 µl de cada cebador 10 µM (Isogen Life Science, De Meern, Netherlands), 0,5 µl de Taq polimerasa de 5 U/µl (BIOTOOLS B&M Labs, S.A, Madrid, Spain) y 37,1 µl de agua destilada estéril. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso previo de desnaturalización a 95° C durante 15 minutos, tras el cual se añade la Taq polimerasa; seguido de 35 ciclos con las condiciones siguientes: 95 ° C durante 30 segundos, 55 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 60 segundos, con una extensión final a 72 ° C durante 7 minutos.

**Tabla MM-7.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen *β-giardina*

Gen	Cebador	Secuencia de 5' a 3'	Pares de base	Referencia
<i>β-giardina</i>	G7 G759	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	753	Cacció <i>et al.</i> , 2002
	G1 G2	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG CTCGACGAGCTTCGTGTT	511	Lalle <i>et al.</i> , 2004

### 3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de la segunda PCR de *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium* spp. y para la observación del patrón de bandas PCR-RFLP que se obtiene para diferenciar las especies de *Cryptosporidium*, se utilizó la electroforesis en un gel de agarosa.

La electroforesis consiste en la separación del ADN en un gel de agarosa. Se basa en la migración unidireccional de esta molécula a través de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo con un tampón a pH 8,0. A este pH, el ADN tiene una carga negativa y migra desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética del ADN depende, sobre todo, de su tamaño y conformación, y se ve poco afectada por la composición de pares de bases o por la secuencia.

La visualización de los fragmentos de ADN se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente, bromuro de etidio, que se intercala entre las dos

cadena de ADN. Este reactivo revela la presencia de una banda de ADN al ser iluminado con luz ultravioleta.

### ***Procedimiento de preparación del gel de agarosa***

La concentración de agarosa que se utiliza está condicionada por el tamaño de los fragmentos de ADN a separar. En nuestro caso se han utilizado geles de agarosa del 1,5% para las segundas PCR de pesos moleculares de aproximadamente 800 pb y del 2% en las que son menores de 400 pb y para bandas que se desea purificar para conseguir una mayor garantía de pureza. Los geles se han preparado según se describe a continuación:

- Se mezclan 1,5 o 2 gramos de agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac) en 100 ml de TBE x 0,5 (Tris 0.045 mM, ácido bórico 0,045 mM, EDTA 0,001 mM, pH 8,0) llevándolo a ebullición hasta su total disolución.
- Se deja enfriar hasta unos 50-60° C aproximadamente y se añade 3 µl de una solución acuosa de bromuro de etidio (BrEt) 0,5 µg/ml por cada 50 ml de gel.
- Se vierte la solución en una bandeja de electroforesis previamente sellada y con el correspondiente molde para formar los pocillos, y se deja solidificar.
- Se retira el molde, con cuidado para no dañar los pocillos, y se coloca la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis llena de tampón TBE x0,5 hasta la medida señalizada.

Se utilizaron cubetas de electroforesis horizontal (BIOCOM DIRECT.COM. Serial N°. BCMS 1509101219 y VARI-GEL. Serial N°. 502) y se desarrolló la electroforesis a 97-100V.

El marcador utilizado fue DNA del Fago  $\lambda$  (Promega 502 µg/ml) digerido con *Pst I* (Advanced Biotechnologies 10 U/µl).

### ***Preparación del marcador DNA del Fago $\lambda$ para un volumen final de 400 $\mu$ l:***

Se realiza la siguiente mezcla:

- 100  $\mu$ l fago  $\lambda$ .
- 40  $\mu$ l tampón multi-core 10x.
- 20  $\mu$ l *Pst I*.
- 240  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MQ (doble destilada, estéril).

Se incuba a 37° C durante 24 horas.

El marcador y las muestras del producto de la segunda PCR fueron mezclados cada uno con una solución de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0,05%, azul de bromofenol): 3  $\mu$ l de solución de carga y 5  $\mu$ l del marcador; para las muestras 3  $\mu$ l de solución de carga y 10  $\mu$ l de muestra. Se dispensa cada una en uno de los pocillos formados por el molde en el gel.

La visualización de los fragmentos de ADN se consiguió iluminando con luz UV de 340 nm mediante un trans-iluminador Viber Lourmet y la captura de las fotos con un capturador de imágenes de la misma casa comercial.

### **3.4.6 Purificación del DNA a partir de la segunda PCR**

Para la purificación de los productos de la segunda reacción de las diferentes PCR se empleó el “Quick Reference Protocol Card. Illustra™ GFX™ PCR DNA and band purification Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, tras la electroforesis se procedió a cortar la banda esperada y/o recoger directamente el producto de la segunda PCR y depositarla en un eppendorf de 1,5 ml.

Primer paso: para la captura de la muestra, se añade a lo anterior 500  $\mu$ l del buffer de captura a la muestra para desnaturalizar las proteínas y/o disolver la agarosa, se agita por inversión. Si la muestra procede de un gel de agarosa se incubará a 60° C hasta su disolución total, observando que el color final sea amarillo o naranja pálido.

Segundo paso: unión de la muestra. Se transfiere la mezcla del primer paso a la columna de illustration GFX Microspin para unir el ADN a la membrana de la misma. Se incuba a temperatura ambiente 1 minuto. Se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 segundos.

Tercer paso: lavado y secado con el buffer de lavado tipo 1 para eliminar sales y otros contaminantes de la membrana ligada al DNA. Se añade 500 µl del buffer de lavado tipo 1 y se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 segundos.

Cuarto paso: tras eliminar cualquier exceso de buffer por centrifugación, se procedió a añadir 20 µl del buffer de elución tipo 6 (agua esterilizada, libre de nucleasas) a la columna, se incuba 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto, se guarda la muestra a -20° C hasta el momento de su electroforesis y/o envío para su secuenciación.

### ***Electroforesis del gen purificado.***

Para valorara los productos de la segunda PCR purificados de *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., y *Cryptosporidium* spp. se utilizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El gel fue preparado con agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac); en tampón TBE 0,5x (Tris-borato 0,045 mM, EDTA 0,001 mM pH 8,0) y tinción con bromuro de etidio (BrEt) 3 µl de solución (0,5 µg/ml) por cada 50 ml de gel.

En una cubeta de electroforesis horizontal (BIOCOM DIRECT.COM. Serial N° BCMS 1509101219 y VARI-GEL. Serial N° 502) se desarrolló la electroforesis a 97-100 V. Se utilizó un buffer 5x (BIOLINE) con un marcador que permita la posterior cuantificación (EasyladderI 100 lanes de BIOLINE): 2 µl de buffer y 3 µl de marcador; y para las muestras la solución de carga: 3 µl de solución de carga y 3 µl de muestra.

La visualización de los fragmentos de ADN se consiguió con un trans-iluminador Viber Lourmet y la captura de las fotos con un capturador de imágenes de la misma casa comercial.

### **3.4.7 Secuenciación**

Los productos de la segunda PCR de *Cryptosporidium* spp. del gen de la subunidad 18S rRNA (*SSUrRNA*) y del gen *gp60*; *Entamoeba* spp. del gen rRNA de las subunidades pequeñas (*SSUrDNA*) y *Giardia* spp. (gen *tpi*, gen *tpi*-Sulaiman y *β-giardina*) fueron purificados con Quick Referente Protocol Card. Illustra™ GFX™ PCR DNA and band purification Kit y llevados al Centro de Análisis Genético de Zaragoza para su secuenciación.

### *Análisis de secuencias*

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando los programas Chromas Lite, Blast tool y BioEdit v7.0.5.3.

## **3.5 Análisis estadísticos de los datos**

Las variables de las entrevistas y los resultados analíticos de las heces se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS 19.0 (licencia de la Universidad de Zaragoza) y Epidat v3.0.

En primer lugar se realizó una descripción de todas las variables de la muestra mediante los estadísticos media y desviación estándar si las variables seguían distribuciones normales y mediana y recorrido intercuartílico si las variables no seguían distribución gausiana. En el caso de variables cualitativas se valoró la proporción de las diferentes variables con su intervalo de confianza al 95% (IC95%). El análisis bivalente y en caso de variables cualitativas se realizó mediante el test de  $\chi^2$  de Pearson y la prueba exacta de Fisher. El análisis post hoc para conocer entre qué valores de las variables existía asociación importante se basó en la valoración de los residuos ajustados de Haberman, realizando la corrección de Bonferroni, en caso de tablas de más de 2x2. La medida de los riesgos asociados a cada factor se realizó mediante el cálculo de la Odds Ratio con su intervalo de confianza al 95%. El nivel de significación fue  $p < 0,05$ . Para las distintas pruebas diagnósticas se evaluó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) tomando como “gold standard” la PCR. La concordancia de los resultados entre los distintos métodos diagnósticos se evaluó mediante el nivel de concordancia y el coeficiente Kappa. Estos datos han sido representados mediante la curva ROC (características operativas del receptor).

Nota: por comodidad los resultados se han dado en porcentajes a pesar del escaso número de muestras presentadas en algunos casos, para subsanar este “error pactado” se ha puesto al lado de cada porcentaje el número de muestra sobre el que se estaba trabajando.

## **Depuración**

Se llevó a cabo una revisión general y exhaustiva de todos los registros, fichas, muestras, resultados encontrados y tratamientos ofrecidos.

## **Verificación y control de calidad de los datos**

Se procedió a la verificación de la coherencia de las bases de datos-fichas (una por una). Para el control de calidad, se escogieron de manera aleatoria el 10% de muestras negativas de las especies caracterizadas para someterlas al mismo procedimiento diagnóstico. Para las técnicas microscópicas, cada muestra fue observada por al menos tres microscopistas diferentes.

## **Estratificación de variables**

Apareamiento y/o cruzamiento de variables según su importancia y su nivel de asociación con otras.

## **3.6 Consideraciones éticas**

La participación fue voluntaria, y de cada sujeto se obtuvo el consentimiento informado y firmado por escrito (**Anexo 5 y 6**). Se mantuvieron encuentros informativos con cada paciente para explicar en qué consistía el estudio, comentar los resultados de su muestra y ofrecerle tratamiento según necesidad (Tabla MM-8). Los tratamientos fueron verificados y controlados a los quince días. Así mismo, se ofrecieron charlas de educación para la salud en cuanto a normas de higiene medioambiental y alimenticia. Cada muestra de heces fue codificada, de tal manera que se garantizara la confidencialidad de los datos correspondientes a las personas que han participado en el estudio. Este estudio fue aprobado y validado por el Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial (**Anexos 7-9**) y por la OMS (oficina de la representación de la Organización Mundial de la Salud en Guinea Ecuatorial) (**Anexos 10 y 11**) y el Comité Ético de Aragón (CEICA, Zaragoza, España).

**Tabla MM-8:** Protocolo de tratamientos antiparasitarios intestinales.

PARÁSITO	MEDICACIÓN	CANTIDAD POR DOSIS	DOSIS DIARIA	DURACIÓN
<i>Entamoeba</i> spp. **	Metronidazol	500 mg.	3	7 días
<i>Blastocystis hominis</i>	Metronidazol	250 mg.	3	10 días
<i>A. lumbricoides</i>	Mebendazol	500 mg.	1	1 día
	Albendazol	400 mg.	1	1 día
<i>T. trichiura</i>	Mebendazol	500 mg.	1	1 día
	Albendazol	400 mg.	1	1 día
<i>S. stercoralis</i>	Mebendazol	300 mg.	2	3 días
	Albendazol	400 mg.	1	1 día
<i>Uncinarias</i> spp.	Albendazol	400 mg.	1	1 día. Repetir a los 15 días
<i>Giardia</i> spp.	Metronidazol	250 mg.	3	7 días
	Albendazol	400 mg.	2	5 días
<i>Schistosoma</i> spp.	Prazicuantel*	600 mg.	2	1 día

\* Son en total 4 comprimidos de 600 mg. cada uno, se toman 2 y se repite la toma a las 6 horas.

\*\* Si presenta síntomas intestinales.

## **CAPÍTULO 4: *TÉCNICAS MICROSCÓPICAS***



***RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS***

---



## 4. RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES

### 4.1 Descripción de la muestra

#### 4.1.1 Participantes VIH positivos

En relación al origen geográfico, 48,8% (260/533) procedían de la Isla de Bioko y 51,2 (273/533) de la Región Continental.

##### Malabo -Isla de Bioko-

De los 260 pacientes VIH positivos participantes en el estudio de la Isla de Bioko, la media de edad fue de  $35,6 \pm 11,0$ , con un rango de 1-63 años. De ellos, el 25,4% (66/260) eran varones y 74,6% (194/260) mujeres. La clasificación por edad recodificada fue la siguiente:

97,3% (253/260) eran adultos, 75,5% (191/253) mujeres y 24,5% (62/253) varones, de ellos, 34,8% (88/253) eran inmunocompetentes, 28,5% (72/253) presentaban una inmunosupresión moderada, 22,1% (56/253) una inmunosupresión avanzada y 13,4% (34/253) una inmunosupresión severa. De las mujeres, 22 estaban embarazadas, 19 con TARV para prevenir la transmisión vertical y 3 sin tratamiento. De todos los adultos, 79 estaban bajo seguimiento clínico y 174 bajo tratamiento antirretroviral, 164 con esquemas terapéuticos de primera línea y 10 con esquemas de segunda línea.

**Tabla VD-1:** Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Adultos. Isla de Bioko

Sexo	Nº	%	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
Varón	62	24,5	15	22	16	9	0	21	41	37	6
Mujer	191	75,5	73	50	40	25	3	58	133	127	4
<b>TOTAL</b>	<b>253</b>	<b>100</b>	<b>88</b>	<b>72</b>	<b>56</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>79</b>	<b>174</b>	<b>164</b>	<b>10</b>

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

El 2,7% (7/260) eran niños, de los cuales el 57,1 (4/7) varones y 42,9 (3/7) niñas; de ellos, el 28,6% (2/7) inmunocompetentes, el 14,3% (1/7) presentaban una

inmunosupresión moderada, el 28,6% (2/7) una inmunosupresión avanzada y el 28,6% (2/7) una inmunosupresión severa. En seguimiento clínico había 5 y bajo tratamiento antirretroviral 2, ambos con esquemas terapéuticos de primera línea.

**Tabla VD-2:** Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Niños. Isla de Bioko

Sexo	Nº	%	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
Varón	4	57,1	2	0	0	2	0	3	1	1	0
Mujer	3	42,9	0	1	2	0	0	2	1	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

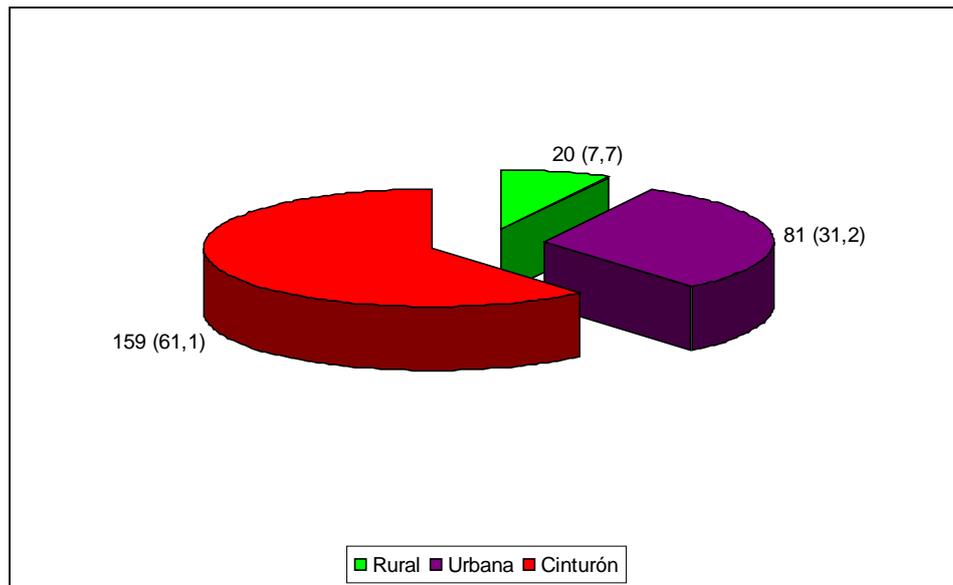
INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

**Tabla VD-3:** Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Datos generales. I. Bioko.

Edad	Sexo	VIH +	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
< 15 años	Varón	4	2	0	0	2	0	3	1	1	0
	Mujer	3	0	1	2	0	0	2	1	1	0
> 15 años	Varón	62	15	22	16	9	0	21	41	37	6
	Mujer	191	73	50	40	25	3	58	133	127	4
<b>TOTAL</b>		<b>260</b>	<b>90</b>	<b>73</b>	<b>58</b>	<b>36</b>	<b>3</b>	<b>84</b>	<b>176</b>	<b>166</b>	<b>10</b>

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

En cuanto al lugar de residencia, los pacientes VIH positivos de la Isla de Bioko viven el 7,7% (20/260) en las zonas rurales, el 31,2% (81/260) en las zonas urbanas y el 61,2% (159/260) en el cinturón urbano.



**Figura VD-1:** Lugar de residencia de los participantes VIH positivos. Isla de Bioko.

En relación a la información higiénica, el 4,6% (12/260) la tenían alta, el 21,9% (57/260) media y el 73,5% (191/260) baja. Nivel de formación académica: el 15,4% (40/260) tenían formación profesional, el 38,5% (100/260) secundaria y el 46,1% (120/260) primaria o nula. Y en cuanto al nivel socioeconómico el 8,5% (22/260) tenían un nivel alto, el 67,3% (175/260) medio y el 24,2% (63/260) bajo.

**Tabla VD-4:** Variables sociológicas en participantes VIH positivos. Con residencia en la Isla de Bioko.

Variable	Alto/Profesional	Medio/Secundaria	Bajo/Primaria-Nula
Formación académica	15,4 (40/260)	38,5 (100/260)	46,1 (120/260)
Información higiénica	4,6 (12/260)	21,9 (57/260)	73,5 (191/260)
Nivel socioeconómico	8,5 (22/260)	67,3 (175/260)	24,2 (63/260)

En cuanto a la sintomatología, el 15,8% (41/260) tenían diarrea, el 12,3% (32/260) estreñimiento y el 31,5% (82/260) presentaban otros síntomas como dolor, aerofagia, retortijones, etc.

## Bata - Región Continental

En la Región Continental, se reclutaron 273 personas VIH positivas, de las que el 62,3% (170/273) procedían de la UREI del Hospital Regional de Bata y el 33,7% (103/273) de la CTA del Centro de Salud M<sup>a</sup> Rafols de Bata. La media de edad fue de 35,94 ± 11,57 (rango 1-65 años), un 23,1% (63/273) varones y un 76,9% (210/273) mujeres. La clasificación por grupos de edad re-codificados fue:

El 97,8% (267/273) eran adultos, de los cuales el 77,2% (206/267) eran mujeres y 22,8% (61/267) varones; de ellos, el 38,2% (102/267) eran inmunocompetentes, el 17,2% (46/267) presentaban inmunosupresión moderada, el 24,7% (66/267) inmunosupresión avanzada y el 19,9% (53/267) inmunosupresión severa. De las mujeres, 17 estaban embarazadas, 4 con TARV para prevenir la transmisión vertical y 13 no fueron tratadas. De todos los adultos, 176 estaban en seguimiento clínico y 91 bajo tratamiento antirretroviral, 87 con esquemas terapéuticos de primera línea y 4 con esquemas de segunda línea.

**Tabla VD-5:** Datos demográficos, estado inmunológico y tratamiento ARV. Adultos. R. Continental.

Sexo	Nº	%	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
Varón	61	22,8	20	8	17	16	0	41	20	18	2
Mujer	206	77,2	82	38	49	37	0	135	71	69	2
<b>TOTAL</b>	<b>267</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>46</b>	<b>66</b>	<b>53</b>	<b>0</b>	<b>176</b>	<b>91</b>	<b>87</b>	<b>4</b>

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

El 2,2% (6/273) eran niños, distribuidos en: el 66,7% (4/6) niñas y el 33,3 (2/6) varones. En cuanto al estado inmunológico, el 33,3% (2/6) fueron inmunocompetentes, 50,0% (3/6) presentaban inmunosupresión avanzada y el 6,7% (1/6) tenían una inmunosupresión severa. En seguimiento clínico había uno y bajo tratamiento antirretroviral cinco, con esquemas terapéuticos de primera línea.

**Tabla VD-6:** Datos demográficos, estado inmunológico y TARV. Niños. Región Continental.

Sexo	VIH +	%	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
Varón	2	33,3	1	0	1	0	0	0	2	2	0
Mujer	4	66,7	1	0	2	1	0	1	3	3	0
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>

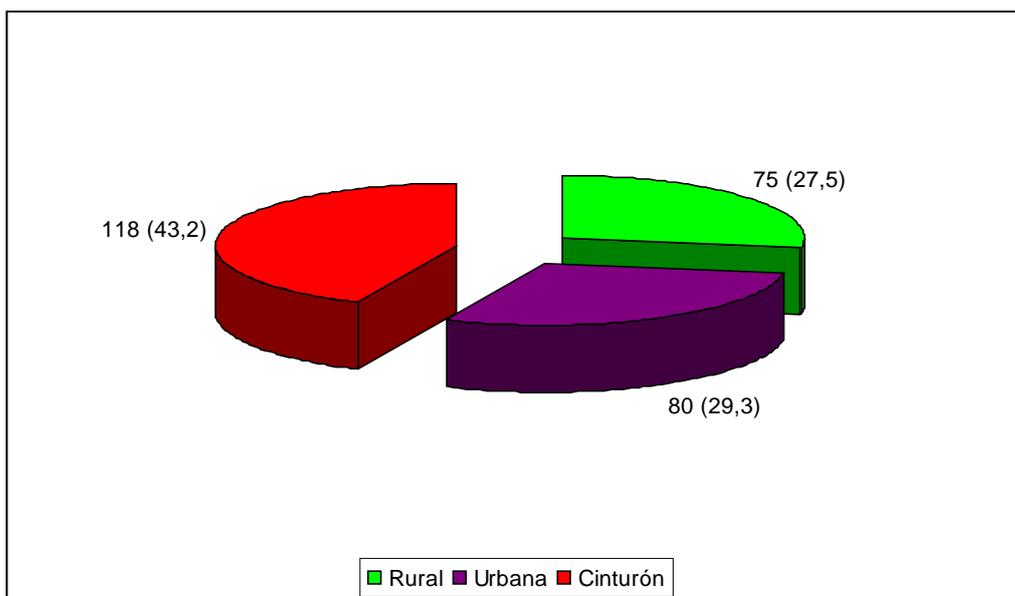
INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

**Tabla VD-7:** Datos demográficos, estado inmunológico y TARV. Datos generales. R. Continental.

Edad	Sexo	VIH +	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Seguimiento	TARV	1ª línea	2ª línea
< 15 años	Varón	2	1	0	1	0	0	0	2	2	0
	Mujer	4	1	0	2	1	0	1	3	3	0
> 15 años	Varón	61	20	8	17	16	0	41	20	18	2
	Mujer	206	82	38	49	37	0	135	71	69	2
<b>TOTAL</b>		<b>273</b>	<b>104</b>	<b>46</b>	<b>69</b>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>177</b>	<b>96</b>	<b>92</b>	<b>4</b>

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

En cuanto al lugar de residencia, los pacientes VIH positivos de la Región Continental viven: el 27,5% (75/273) en las zonas rurales, el 29,3% (80/273) en las zonas urbanas y el 43,2% (118/273) en el cinturón urbano.



**Figura VD-2:** Lugar de residencia de los participantes VIH positivo. Región Continental.

En relación a la información higiénica, el 4,8% (13/273) la tenían alta, el 34,1% (93/273) media y el 61,2% (167/273) baja. Para el nivel de formación, el 9,2% (25/273) tenían formación profesional, 33,3% (91/273) secundaria y el 57,5% (157/273) primaria o nula. Y en cuanto al nivel socioeconómico el 15,8% (43/273) tenían un nivel alto, el 52,7% (144/273) medio y el 31,5% (86/273) bajo.

**Tabla VD-8:** Variables sociológicas en participantes VIH positivos de la Región Continental.

Variable	Alto/Profesional	Medio/Secundaria	Bajo/Primaria-Nula
Formación académica	9,2 (25/273)	33,3 (91/273)	57,5 (157/273)
Información higiénica	4,8 (13/273)	34,1 (93/273)	61,2 (167/273)
Nivel socioeconómico	15,8 (43/273)	52,7 (144/273)	31,5 (86/273)

En cuanto a la sintomatología, el 17,2% (47/273) tenían diarrea, el 16,8% (46/273) estreñimiento y el 47,6% (130/273) presentaban otros síntomas como dolor, aerofagia, retortijones, etc.

### 4.1.2 Participantes VIH negativos

Se seleccionaron 110 pacientes, con el criterio de convivir en el hogar con una persona infectada del VIH/SIDA que participe en el estudio y que presente algún parásito de transmisión persona a persona como *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y/o *Entamoeba* spp. Para estos pacientes, se recogió una muestra de heces y se les pasó el mismo cuestionario que a los pacientes VIH positivos objeto del estudio. En relación al origen geográfico:

#### **Malabo -Isla de Bioko-**

El 45,5% (50/110) del total de los participantes VIH negativos procedían de la Isla de Bioko (Región Insular del país), la edad media fue de  $27,0 \pm 17,9$  (rango 3-57 años). Con una proporción de adultos del 66,0% (33/50), de ellos el 42,2% (14/33) eran varones y el 57,6% (19/33) mujeres, de éstas, dos embarazadas. Para los menores de 15 años la proporción fue de 34,0% (17/50), de los cuales el 64,7% (11/17) fueron niñas y el 35,3% (6/17) niños. En cuanto al lugar de residencia, el 6,0% (3/50) de los participantes vivían en zonas rurales, el 44,0% (22/50) en el área urbana y el 50,0% (25/50) en el cinturón urbano.

Variables socio-económicas: para el nivel de formación, el 30,0% (15/50) tenían formación profesional, el 24,0% (12/50) secundaria y el 46,0% (23/50) primaria o nula. En cuanto a la información higiénica, el 28,0% (14/50) la tenían alta, el 24,0% (12/50) media y el 48,0% (24/50) baja. La proporción para el nivel socioeconómico fue: el 10,0% (5/50) alto, el 78,0% (39/50) medio y el 12,0% (6/50) bajo.

En relación a la sintomatología presentaban diarrea el 4,0% (2/50), estreñimiento el 4,0% (2/50) y 8,0% (4/50) otros síntomas como dolor abdominal, aerofagia, retortijones, etc.

#### **Bata - Región Continental**

El 54,5% (60/110) de los participantes del grupo VIH negativos procedían de Bata – Región Continental-, con una edad media de  $27,68 \pm 17,6$  (rango 3-76 años), el 73,3% (44/60) de los participantes eran mayores de 15 años, 25,0% (11/44) varones y 75,0% (33/44) mujeres, de éstas, 4 embarazadas. El 26,6 % (16/60) fueron menores de 15 años,

8 niños y 8 niñas. En cuanto al lugar de residencia, el 8,3% (5/60) de los participantes vivían en las zonas rurales, el 53,3% (32/60) en las áreas urbanas y el 38,3% (23/60) en el cinturón urbano.

VARIABLES SOCIOLOGICAS: nivel de formación académica: el 11,6% (7/60) tenían formación profesional, el 38,3% (23/60) tenía educación secundaria y el 50,0% (30/60) primaria o nula; información higiénica, el 10,0% (6/60) alta, el 40,0% (24/60) media y el 50,0% (30/60) baja; nivel socioeconómico: el 8,3% (5/60) lo tenía alto, el 73,3% (44/60) medio y el 18,3% (11/60) bajo.

Sintomatología el 54,0% (3/60) presentaban diarrea, el 15,0% (9/60) estreñimiento y el 28,3% (17/60) otros síntomas como dolor, aerofagia, retortijones, etc.

**Tabla VD-9:** Variables sociológicas. Valor absoluto y relativo. VIH negativo. I. Bioko y R. Continental.

VARIABLE	ALTO/PROFESIONAL		MEDIO/SECUNDARIA		BAJO/PRIMARIA-NULA	
	ISLA	CONTIN.	ISLA	CONTIN.	ISLA	CONTIN.
<b>Formación académica</b>	30,0 (15/50)	11,6 (7/60)	24,0 (12/50)	38,3 (23/60)	46,0 (23/50)	50,0 (30/60)
<b>Información higiénica</b>	28,0 (14/50)	10,0 (6/60)	24,0 (12/50)	40,0 (24/60)	48,0 (24/50)	50,0 (30/60)
<b>Nivel socioeconómico</b>	10,0 (5/50)	8,3 (5/60)	78,0 (39/50)	73,3 (44/60)	12,0 (6/50)	18,3 (11/60)

**Tabla VD-10:** Variables demográficas. Valor absoluto y relativo. VIH negativo. Bioko y Continente.

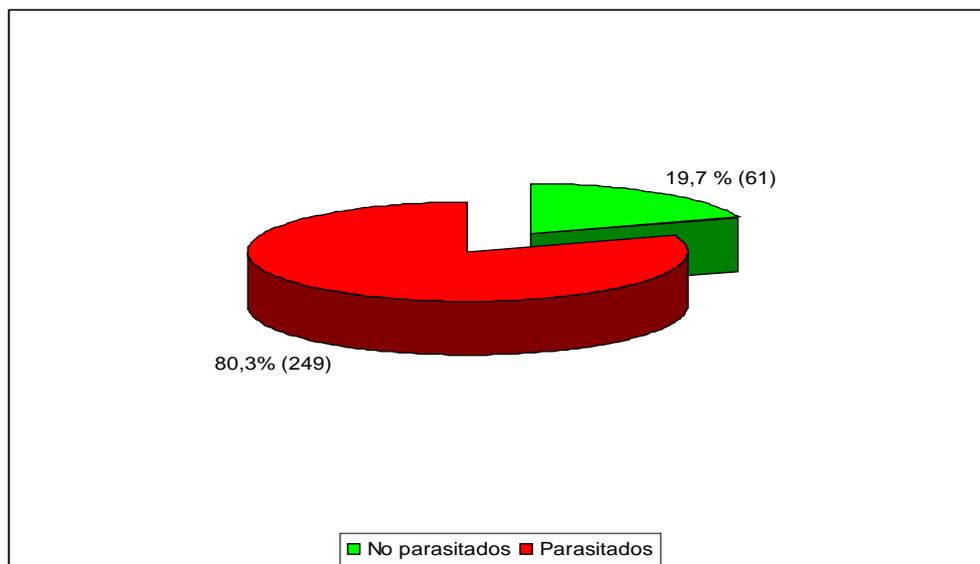
ZONA	R. INSULAR	R. CONTINENTAL	TOTAL
RURAL	6,0 (3/50)	8,3 (5/60)	7,3 (8/110)
URBANO	44,0 (22/50)	53,3 (32/60)	49,1 (54/110)
CINTURÓN	50,0 (25/50)	38,3 (23/60)	43,6 (48/110)

## **4.2 Resultados de la aplicación de las técnicas microscópicas para la detección de parásitos intestinales**

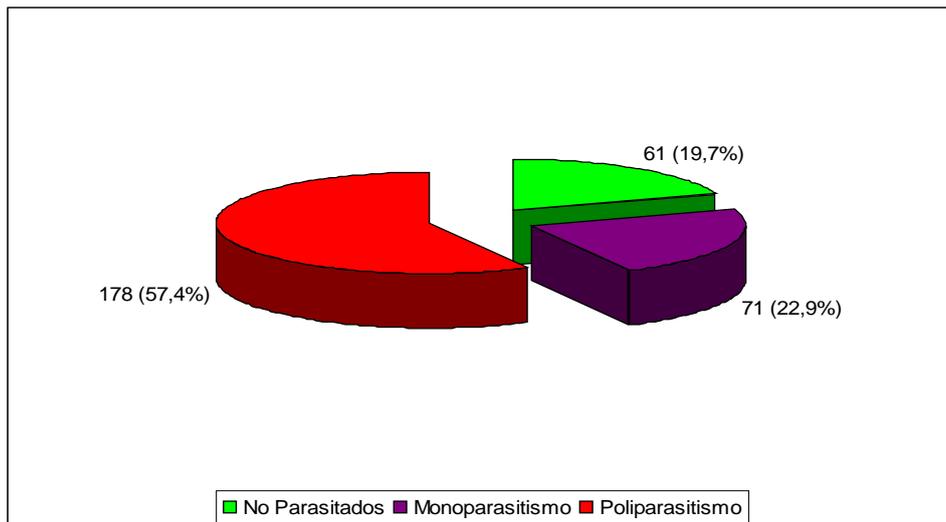
### **4.2.1 Concordancia entre las técnicas microscópicas con y sin concentración**

#### **Malabo –Isla de Bioko-**

El 80,3% (249/310) de las muestras de los participantes de la Isla de Bioko fueron positivas para al menos un parásito intestinal, sin asociación estadísticamente significativa entre la coinfección por parásitos intestinales y la infección por VIH. En 178 participantes se detectó poliparasitismo.



**Figura VD-3:** Muestras positivas para al menos un parásito en los participantes de la Isla de Bioko.



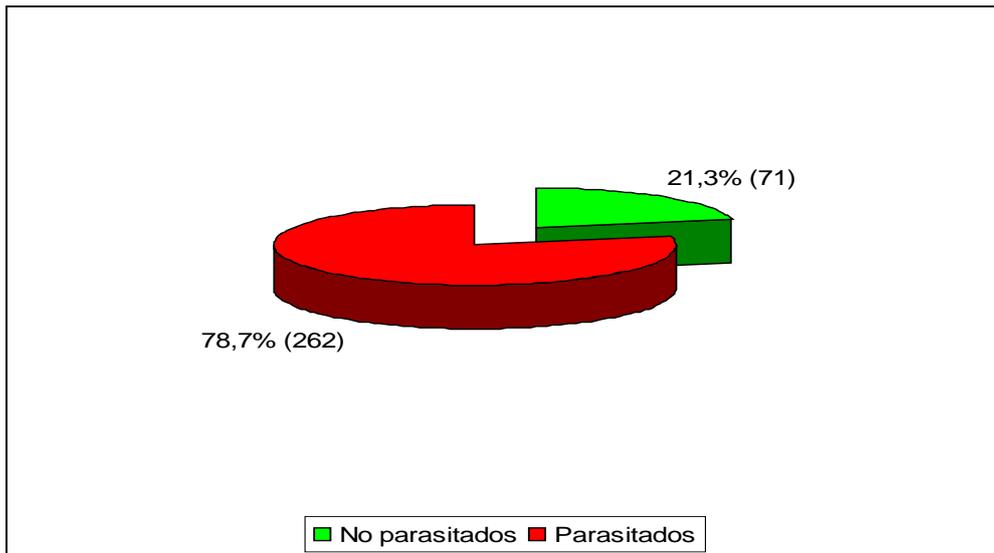
**Figura VD-4:** Parasitismo en la Isla de Bioko.

La concordancia entre las técnicas microscópicas con y sin concentración, medida con el índice de concordancia Kappa fue de 0,185. El método de concentración con formaldehído permitió la detección de parásitos intestinales que no habían sido visualizados mediante examen en fresco con suero fisiológico y lugol en 103 muestras. En 11 (10,7%) de ellas, anteriormente no se había observado ningún parásito.

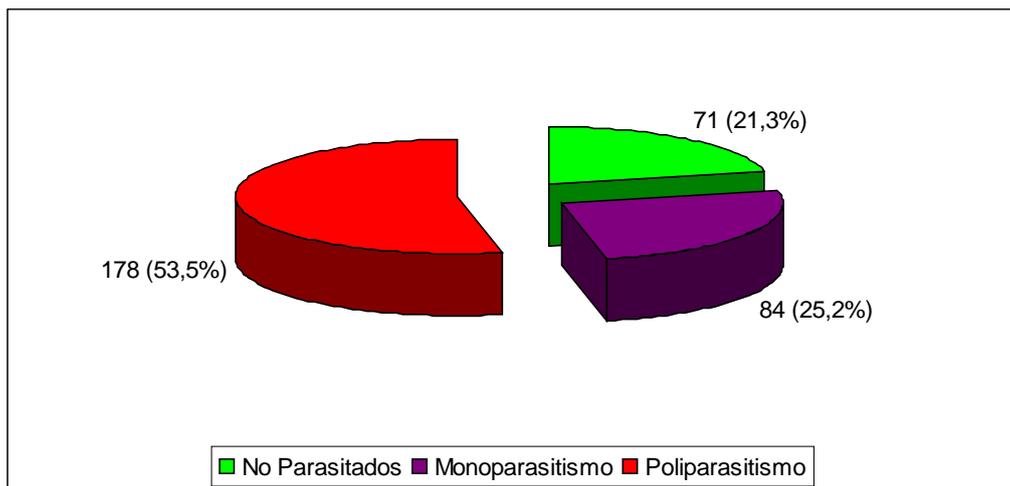
Estas desigualdades se traducen en diferencias en el diagnóstico del 34,6% (90/260) de las muestras de pacientes VIH positivos y un 26,0% (13/50) en las de los VIH negativos.

#### **Bata - Región Continental-**

El 78,7% (262/333) de las muestras de la Región Continental fueron positivas para al menos un parásito intestinal, no habiendo asociación estadísticamente significativa entre la coinfección del participante por parásitos intestinales y por el VIH. Se observó poliparasitismo en 178 muestras.



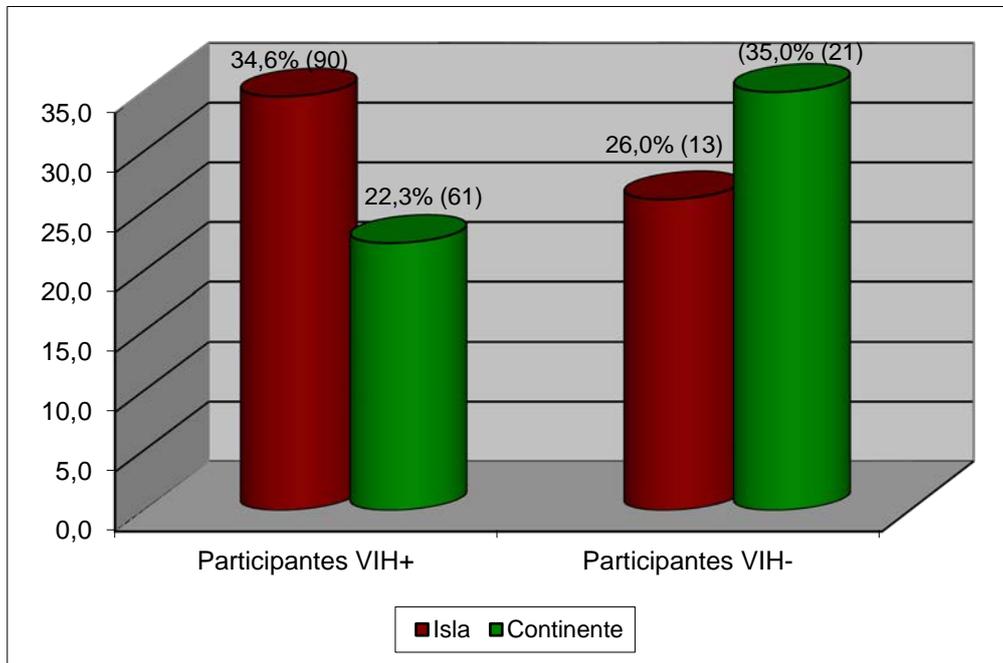
**Figura VD-5:** Muestras positivas para al menos un parásito en los participantes de la R. Continental.



**Figura VD-6:** Parasitismo en la Región Continental.

La evaluación de la concordancia entre ambas técnicas microscópicas, con y sin concentración, medida con el índice de concordancia Kappa fue de 0,163. El método de concentración con formaldehído-acetato de etilo, permitió la detección de parásitos intestinales que no habían sido detectados mediante examen en fresco de una suspensión en suero fisiológico y lugol, en 82 muestras. Siete (8,5%) de ellas, pertenecían a pacientes en los que no se había observado previamente ningún parásito.

La diferencia entre los dos métodos afectó al diagnóstico de un 22,3% (61/273) de las muestras de pacientes VIH positivos y de un 35,0% (21/60) de las de los VIH negativos.



**Figura VD-7:** Diferencias entre microscopia con y sin concentración. Isla/Continente.

En toda la población estudiada y considerando los grupos VIH positivos y VIH negativos de forma independiente, no se encontró asociación entre la infección parasitaria y la edad, el género, el nivel socioeconómico, la formación académica, la información higiénica, los síntomas o el embarazo. La única asociación hallada fue respecto a la zona de residencia ( $p=0,041$ ) que refleja que las zonas con mayor proporción son las urbanas y el cinturón urbano, respecto a la zona rural.

## 4.2.2 Resultados de los participantes del estudio

### 4.2.2.1 Participantes VIH positivos

#### *Malabo -Isla de Bioko-*

El 81,5% (212/260) de los participantes VIH positivos estaban infectados por uno o más parásitos intestinales, siendo la asociación estadísticamente significativa ( $p=0,048$ ). Los pacientes que vivían en el cinturón urbano fueron los que presentaron el mayor

porcentaje de parasitosis intestinal (Tabla VD-11). Además, se observó poliparasitismo en el 58,5% (152/260) de los participantes, con un rango de 0 a 7 parásitos encontrados simultáneamente en la misma persona, una moda de 2 parásitos y una media de  $2,0 \pm 1,5$  parásitos por paciente. El lugar de residencia con menor rango de poliparasitismo correspondió a la zona rural con un máximo de tres parásitos en la misma persona. La Tabla VD-12 muestra la intensidad de parasitismo en esta población. Solamente se encontró poliparasitismo en adultos [60,0% (152/253)], no encontrándose asociación significativa entre el número de parásitos y el estado inmunológico o estar bajo TARV.

**Tabla VD-11:** Distribución de la infección por parásitos intestinales según el lugar de residencia. Isla/Continente.

ZONA DE RESIDENCIA	HIV+ ISLA % (*)	HIV+ CONTINENTE % (*)
Rural	6,1 (13/212)	24,3 (51/210)
Urbano	29,7 (63/212)	30,5 (64/210)
Cinturón urbano	64,2 (136/212)	45,2 (95/210)
<b>TOTAL</b>	<b>100 (212)</b>	<b>100 (210)</b>
<b>p-valor</b>	<b>0,048</b>	<b>0,098</b>

(\*) = Número de participantes infectados por parásitos intestinales en cada zona/total de infectados VIH+.

**Tabla VD-12:** Número de parásitos que se encuentran simultáneamente en los pacientes VIH+ Isla/Continente.

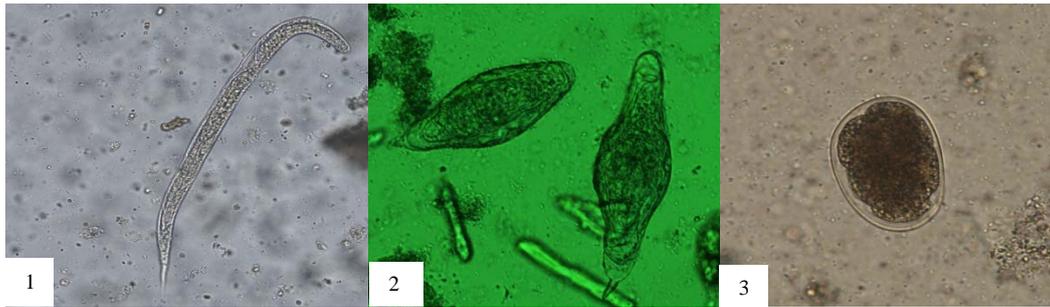
Nº de parásitos	HIV+ Isla n=260	% IC	HIV+ Continente n=273	% IC
7	2	0,8 (0,09-2,7)	1	0,4 (0,009-2,0)
6	7	2,7 (0,5-4,8)	8	2,9 (0,7-5,1)
5	7	2,7 (0,5-4,8)	13	4,8 (2,0-7,5)
4	29	11,2 (7,1-15,2)	17	6,2 (3,1-9,2)
3	35	13,5 (9,1-17,8)	41	15,0 (10,6-19,4)
2	72	27,7 (22,0-33,3)	62	22,7 (17,5-27,8)
1	60	23,1 (17,7-28,4)	68	24,9 (19,6-30,2)
0	48	18,5 (13,5-23,4)	63	23,1 (17,9-28,2)

Los pacientes con una combinación de 7 parásitos simultáneos fueron dos mujeres adultas. Una de ellas con una inmunosupresión avanzada y estaba bajo TARV, albergaba los siguientes parásitos: *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba coli*, *Pentatrichomonas hominis*, *Blastocystis hominis*, *Ascaris lumbricoides* y *T. trichiura*. La otra paciente estaba embarazada, era inmunocompetente y se encontraba bajo TARV. Esta última albergaba los siguientes parásitos: *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba coli*, *I. bütschlii*, *Chilomastix mesnili*, *Schistosoma intercalatum/guineensis* y *T. trichiura*. Ambas vivían en el cinturón urbano de Malabo.

La infección con al menos un parásito intestinal se asoció con la edad ( $p=0,003$ ), dado que el 83,0% (210/253) de los participantes adultos estaban parasitados frente al 28,6% (2/7) de los niños y a la información higiénica, siendo, los participantes con nivel bajo de información higiénica los que presentaban un mayor porcentaje [85,3% (163/191)  $p=0,004$ ]. Sin embargo, no hubo asociación estadísticamente significativa, entre infección parasitaria intestinal y el género, el nivel socioeconómico, los síntomas o el estado inmunológico. Respecto al nivel académico, se observa que la infección parasitaria fue mayor en pacientes con formación secundaria [84,0% (84/100)] y primaria o nula [83,3% (100/120)] que en aquellos que tenían formación profesional [70,0% (28/40)], aunque sin alcanzar la significación estadística.

Cuando los síntomas se estudiaron por separado, se encontró asociación significativa entre el estado inmunológico y diarrea, destacando que el 36,4% (12/33) de los participantes que tenían diarrea, también tenían inmunosupresión severa ( $p= 0,003$ ).

Se encontraron quince parásitos diferentes, como se muestra en la Tabla VD-13, con una proporción del 62,3% (162/260) de participantes infectados por algún helminto patógeno, considerando como tales: *Trichuris*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Schistosoma* spp. y *Uncinari* (Figura VD-8 y VD-9) y del 47,7% (124/260) infectados por protozoos patógenos, considerando como tales: *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* y *Giardia duodenalis*.

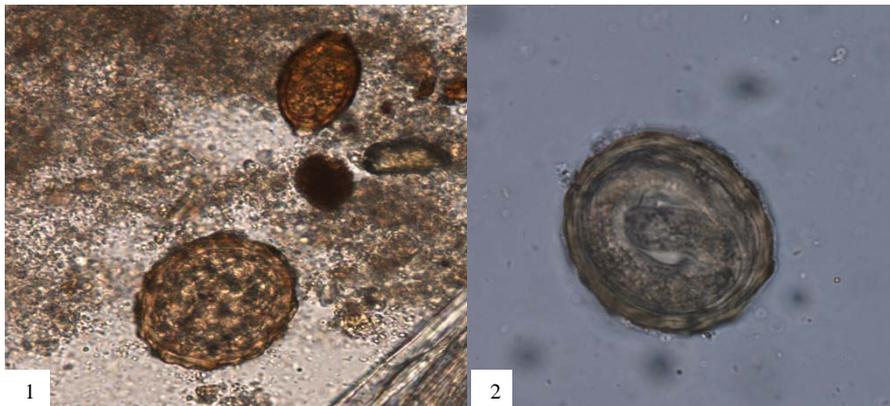


1: Larva de *S. stercoralis*; 2: Huevos de *Schistosoma* spp.; 3: Huevo de *Uncinaria*

**Figura VD-8:** Helmintos patógenos: *Strongyloides*, *Schistosoma* y *Uncinaria*.

La proporción de protozoos oportunistas encontrada en este grupo fue del 35,0% (91/260), considerando como tales: *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *Blastocystis hominis*, *E. nana* y *Chilomastix mesnili*; aunque la patogenicidad de *Blastocystis hominis* se encuentra en entredicho.

Considerando el total de parásitos intestinales identificados en el grupo VIH positivos de la Isla de Bioko, el 46,9% (242/516) correspondían a helmintos patógenos, el 27,9% (144/516) a protozoos patógenos y el 25,2% (130/516) protozoos oportunistas.



1: Huevos de *Ascaris* y *Trichuris*; 2: Huevo embrionado de *Ascaris*

**Figura VD-9:** Helmintos patógenos: *Trichuris trichiura* y *Ascaris lumbricoides*.

En este estudio no se han encontrado cestodos, ni otros protozoos como *Isospora* o *Cyclospora*.

**Tabla VD- 13:** Proporción de parásitos intestinales en pacientes VIH positivos en la Isla/Continente.

PARASITO	HIV+ Isla (n= 260)	%IC	HIV+ Continente (n= 273)	%IC
<i>T. trichiura</i>	134	51,5 (45,3-57,8)	124	45,4 (39,3-51,5)
<i>A. lumbricoides</i>	50	19,2 (14,2– 24,2)	63	23,1 (17,9– 28,2)
<i>S. stercoralis</i>	23	8,8 (5,2 – 12,5)	28	10,3 (6,5 – 14,0)
Uncinarias	11	4,2 (1,6 – 6,9)	11	4,0 (1,5 – 6,5)
<i>S. intercalatum/guineensis</i>	24	9,2 (5,5– 12,9)	19	7,0 (3,7– 10,2)
<i>Schistosoma mansoni</i>	0	0	1	0,4 (0,01 – 2,0)
<i>Entamoeba</i> spp.	112	43,1 (36,9- 9,3)	101	37,0 (31,1- 42,9)
<i>Giardia duodenalis</i>	32	12,3 (8,1– 16,5)	14	5,1 (2,3– 7,9)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	24	9,2 (5,5 – 12,9)	8	2,9 (0,7 – 5,1)
<i>Entamoeba coli</i>	41	15,8 (11,1– 20,4)	33	12,1 (8,0– 16,1)
<i>E. nana</i>	13	5,0 (2,1 – 7,8)	58	21,2 (16,2 – 26,3)
<i>E. hartmanni</i>	1	0,4 (0,01 – 2,1)	1	0,4 (0,01 – 2,0)
<i>Blastocystis hominis</i>	28	10,8 (6,8 – 14,7)	16	5,9 (2,9 – 8,8)
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	11	4,2 (1,6 – 6,9)	7	2,6 (0,5 – 4,6)
<i>Chilomastix mesnili</i>	11	4,2 (1,6 – 6,9)	3	1,1 (0,2 – 3,2)
<i>I. bütschlii</i>	1	0,4 (0,01 – 2,1)	16	5,9 (2,9 – 8,8)
<b>TOTAL PARASITOS</b>	<b>516</b>		<b>503</b>	

Todos los pacientes parasitados por *S. stercoralis* y por *Chilomastix mesnili* pertenecieron al grupo de participantes VIH positivos y todos eran adultos. Además, *Chilomastix mesnili* infectó solo a mujeres. También eran adultos todos los participantes infectados con *Trichuris trichiura*, con una proporción más alta en los que vivían en el cinturón urbano de Malabo que en los que vivían en áreas urbanas y rurales.

*Ascaris lumbricoides* fue detectado solamente en participantes pertenecientes a un nivel socioeconómico bajo o medio, asociado estadísticamente con la variable género, siendo las mujeres el 90,0% (45/50) de los infectados por este helminto [ $p = 0,005$ , OR = 3,7, (1,4 – 9,7)].

En cuanto a la infección por *Schistosoma intercalatum/guineensis* en este grupo, la proporción de infectados fue mayor entre las mujeres, con el 91,7% (22/24), frente al 8,3% (2/24) en los varones [ $p = 0,044$ , OR = 4,1 (0,9-17,9)], aunque el análisis bivariante no haya confirmado la asociación significativa entre género y la infección.

En el caso de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, sólo se da asociación respecto al lugar de residencia [ $p=0,023$ , OR=4,7 (1,3-16,5)], siendo el 67,0% (75/112) de las

personas infectadas residentes del cinturón urbano de Malabo, frente a un 30,4% (34/112) de residentes de las zonas urbanas y el 2,7% (3/112) de la zona rural.

La parasitación por *Entamoeba coli* sólo se dio en participantes del cinturón urbano y de la zona urbana de Malabo.

La infección por *Cryptosporidium* spp. apareció asociada con el nivel socioeconómico, con una proporción mayor entre personas pertenecientes a los niveles bajo y medio [91,7% (22/24)], frente al 8,3% (2/24) del nivel alto ( $p=0,032$ ).

Por otro lado, en los participantes de este grupo, se observó asociación entre la infección por *Ascaris* y *Trichuris* ( $p=0,004$ ), por *Entamoeba* spp. y *Blastocystis* ( $p=0,046$ ); y por *Entamoeba* spp. y *Giardia* ( $p=0,018$ ).

#### ***Bata - Región Continental-***

El 76,9% (210/273) de los participantes VIH positivos estaban infectados con uno o más parásitos. Un factor de gran influencia fue el lugar de residencia, siendo el porcentaje de pacientes parasitados mayor en el cinturón urbano, aunque no se haya encontrado asociación entre el lugar de residencia y la infección por parásitos intestinales, como puede observarse en la Tabla VD-11.

Se observó poliparasitismo en el 52,0% (142/273) de los pacientes VIH positivos, con un rango de 0 a 7 parásitos encontrados simultáneamente en la misma persona, una moda de 1 parásito y una media de  $1,84 \pm 1,59$  parásitos por paciente (Tabla VD-12). La única persona con una combinación de 7 parásitos simultáneos fue una mujer adulta, inmunocompetente que residía en el cinturón urbano y presentaba los siguientes parásitos: *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, *Entamoeba coli* y *E. nana*, *T. trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *S. stercoralis* y *Schistosoma intercalatum/guineensis*.

El 81,4% (144/177) de las personas sin TARV se encontraban parasitadas, frente a un 68,8% (66/96) de parasitados entre las personas bajo TARV ( $p=0,018$ ). La asociación con el estado inmunológico ( $p=0,017$ ), se traduce en que un 84,8% (39/46) de los participantes infectados presentaban una inmunosupresión moderada frente al 63,0% (34/54) de los que presentaban una inmunosupresión severa.

No se encontró asociación de la infección parasitaria intestinal con el género, la edad, el nivel socioeconómico, el nivel de formación académico, la información higiénica o los síntomas. Sin embargo, la infección parasitaria fue mayor entre los pacientes con formación primaria/nula [79,6% (125/157)] frente a los que tenían nivel secundario y de formación profesional [73,3% (85/116)]. Cuando los síntomas se estudiaron por separado, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre género y diarrea, ya que el 31,7% (20/63) de los participantes varones tenían diarrea, ( $p=0,001$ ), frente al 12,9% (27/210) de las mujeres. Con el estado inmunológico se observa una tendencia ( $p=0,06$ ) a presentar diarrea entre los participantes que padecen una inmunosupresión severa [29,6% (16/54)]. Para otros síntomas (dolor epigástrico, retortijones...), también se dio asociación con el género, ya que una mayoría de varones presentaban otros síntomas [63,5% (40/63) ( $p=0,004$ )]; con el TARV [54,8% (97/177) sin TARV ( $p=0,001$ )]; y con la información higiénica [55,1% (92/167) con un nivel de información higiénica baja,  $p=0,008$ ].

En este grupo se encontraron dieciséis parásitos intestinales diferentes (Tabla VD-13). La proporción de pacientes infectados con algún helminto patógeno fue del 58,2% (159/273), siendo los detectados: *Trichuris*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Schistosoma* spp. y Uncinarias. En el caso de los protozoos patógenos, la prevalencia fue del 38,1% (104/273) considerando como tales: *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* y *Giardia duodenalis*.

La proporción de protozoos oportunistas encontrada en este grupo fue del 34,4% (94/273), que incluyen (Figura VD-10): *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *Blastocystis hominis*, *E. nana* y *Chilomastix mesnili*.



1: Quiste de *E. coli*; 2: Quistes de *Chilomastix*; 3: *Blastocystis*

**Figura VD-10:** Protozoos oportunistas: *Chilomastix*, *Entamoeba coli* y *Blastocystis hominis*.

Por otra parte, considerando el total de parásitos intestinales identificados en el grupo VIH positivos de la Región Continental, el 48,9% (246/503) correspondían a helmintos patógenos, el 22,9% (115/503) a protozoos patógenos y el 28,2% (142/503) protozoos oportunistas.

En este estudio no se han detectado cestodos ni otros protozoos como *Isospora* o *Cyclospora*.

La proporción de personas VIH positivas parasitadas por protozoos patógenos fue mayor en la Isla de Bioko que en la Región Continental, siendo la diferencia estadísticamente significativa [ $p < 0,025$  OR=1,5 (1,0-2,1)].

Todos los pacientes infectados por *Schistosoma mansoni*, *E. hartmanni* y *Chilomastix mesnili* eran adultos, mujeres y VIH positivas.

La infección por *Trichuris trichiura* se asoció con el género, ya que el 83,1% (103/124) de los infectados por este helminto [ $p = 0,028$ , OR=1,9 (1,0-3,5)] eran mujeres; con el nivel de formación académica más bajo el 64,5% (80/124) ( $p = 0,013$ ); el socioeconómico medio [55,6% (69/124) ( $p = 0,013$ )] y con el estado inmunológico, siendo la proporción mayor en los participantes inmunocompetentes [45,2% (56/124) ( $p = 0,041$ )].

En cuanto a la infección por *Schistosoma intercalatum/guineensis*, en este grupo la proporción de la infección ha sido mayor en la mujer con el 84,2% (16/19) frente al 15,8% (3/19) de infección en los hombres y se ha dado sólo en adultos. La infección por

*Schistosoma* spp. se ha asociado con el lugar de residencia, siendo el 89,5% (17/19) de los infectados residentes en el cinturón urbano ( $p < 0,001$ ).

La infección por *Iodamoeba bütschlii* se asoció al TARV, siendo mayor la proporción de las personas infectadas que no están bajo tratamiento antirretroviral [87,5% (14/16)  $p = 0,05$  OR=4,0 (0,9-18,1)]. De la misma manera, las infecciones producidas por *E. nana* y *Blastocystis* se asociaron con TARV, siendo mayor entre los infectados la proporción de pacientes sin TARV ( $p < 0,005$ ). En cambio *Pentatrichomonas* se asoció en las personas con diarrea [8,5% (4/47),  $p = 0,005$  OR=6,9 (1,5-32,0)].

En el caso de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, se encontró asociación con otros síntomas [ $p = 0,047$  OR=1,6 (1,0-2,7)], ya que el 73,3% (74/101) de personas parasitadas presentaban retortijones, dolor epigástrico... La infección por *E. histolytica/dispar/moshkovskii* también se asoció al nivel de información higiénica ( $p = 0,043$ ), un 70,3% (71/101) de personas infectadas tenían nivel bajo de información higiénica. Así mismo, el 67,3% (68/101) de las personas infectadas tenían un nivel de formación académica primaria/nula ( $p = 0,039$ ). De igual manera, se ha dado una asociación entre la infección por *Entamoeba* spp. respecto al TARV [ $p = 0,006$  y OR=2,1 (1,2-3,7)], con una mayor probabilidad de adquirir la infección en pacientes que no están recibiendo tratamiento antirretroviral.

Por otra parte, la infección por *Entamoeba coli* sólo se ha dado en participantes con nivel de formación primaria/nula [75,8% (25/33)] y secundaria [24,2% (8/33)]. Esta parasitosis aparece asociada a otros síntomas, con un 63,6% (21/33) de las personas infectadas que presentaban dolor gástrico, retortijones [ $p = 0,049$ ; OR=2,1 (1,0-4,4)].

En el caso de *E. nana*, la infección se asoció al TARV ya que un 82,8% (48/58) de los pacientes infectados no recibían tratamiento antirretroviral [ $p = 0,001$  OR=3,2 (1,5-6,6)].

En la infección por *Blastocystis hominis*, la proporción de mujeres infectadas alcanzó el 56,3% (9/16), frente al 43,8% (7/16) de varones [ $p = 0,043$  OR=0,36 (0,12-1,0)] También apareció asociada con el TARV, así el 87,5% (14/16) de los pacientes parasitados no estaba recibiendo tratamiento antirretroviral [ $p = 0,05$  OR=4,0 (0,9-18,1)].

Todos los casos de infección por *Cryptosporidium* spp. se dieron en personas que no están bajo TARV.

En los participantes de este grupo se dio asociación entre infección por *Ascaris* y por *Trichuris* ( $p < 0,001$ ) y entre la infección por *Schistosoma intercalatum/guineensis* y por *Pentatrichomonas hominis* ( $p = 0,023$ ).

La infección por *E. nana* aparece asociada a infección por *Entamoeba coli* ( $p < 0,001$ ), *Iodamoeba bütschlii* ( $p < 0,001$ ) y *Blastocystis hominis* ( $p < 0,001$ ). También existe asociación entre infección por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* y *Blastocystis hominis* ( $p < 0,001$ ) así como por *E. nana* ( $p < 0,001$ ), Uncinarias ( $p = 0,012$ ) y *Giardia* ( $p = 0,001$ ).

#### 4.2.2.2 Participantes VIH negativos

##### *Malabo – Isla de Bioko-*

El 74,0% (37/50) de los participantes de este grupo fueron positivos para al menos un parásito intestinal y, como en el grupo de participantes VIH positivos de esta región insular, la infección parasitaria intestinal fue mayor en el cinturón urbano (Tabla VD-14).

**Tabla VD-14:** Distribución de la infección por parásitos intestinales según el lugar de residencia. Isla/Continente.

ZONA DE RESIDENCIA	HIV- ISLA % (*)	HIV- CONTINENTE % (*)
Rural	2,7 (1/37)	7,7 (4/52)
Urbano	37,8 (14/37)	55,8 (29/52)
Cinturón urbano	59,5 (22/37)	36,5 (19/52)
<b>TOTAL</b>	<b>100 (37)</b>	<b>100 (52)</b>
<b>p-valor</b>	<b>0,042</b>	<b>0,62</b>

(\*) = Número de participantes infectados por parásitos intestinales en cada zona/total de infectados VIH-.

Se observó poliparasitismo en el 52,0% (26/50), con una media de parásitos por paciente de  $2,18 \pm 2,09$  y el rango de 0-7 parásitos (Tabla VD-15), siendo más frecuente la coinfección de parásitos intestinales en las personas menores de 15 años, grupo de edad en el cual sólo se encontraron casos de poliparasitismo. El paciente con una combinación de 7 parásitos fue una niña de 6 años, que residía en la zona urbana de Malabo y presentaba los siguientes parásitos: *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, *Giardia*

*duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *E. nana* y *S. stercoralis*.

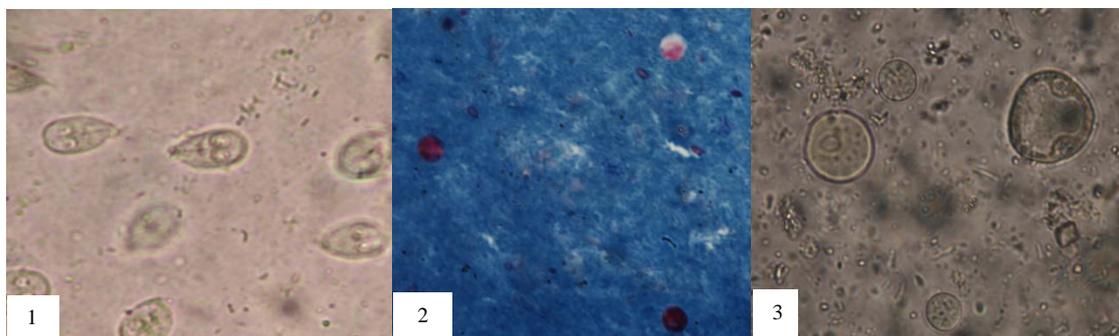
**Tabla VD- 15:** Número de parásitos que se encuentran simultáneamente. Pacientes VIH-. Isla/Continente.

Nº de parásitos	HIV- Isla n=50	% IC	HIV- Continente n=60	% IC
8	0	0	1	1,7(0,04-8,9)
7	1	2,0 ( 0,05-10,6)	0	0
6	5	10,0 (3,2- 21,8)	1	1,7 (0,04-8,9)
5	3	6,0 (1,2-16,5)	5	8,3 (2,7-18,3)
4	4	8,0 (2,2-19,2)	5	8,3 (2,7-18,3)
3	4	8,0 (2,2-19,2)	8	13,3 (3,9-22,7)
2	9	18,0 (6,3-29,6)	16	26,7 (14,6-38,7)
1	11	22,0 (9,5-34,5)	16	26,7 (14,6-38,7)
0	13	26,0 (12,8-39,1)	8	13,3 (3,9-22,7)

La asociación de la infección parasitaria con las variables de edad, nivel socioeconómico, síntomas o embarazo no fue estadísticamente significativa. En este grupo, sólo 8 participantes presentaron síntomas y de ellos, 7 estaban parasitados. Sin embargo, sí que se encontró asociación entre infección y género [p= 0,035, OR= 5,2 (1,0 – 26,8)], con el 90,0% (18/20) de los varones de este grupo parasitados; y también entre infección parasitaria intestinal y nivel de formación académica (p <0,001). La infección parasitaria intestinal fue mayor en los participantes con nivel de formación primaria/nula con el 91,3% (21/23) de los participantes y secundaria con el 91,7% (11/12); siendo más baja en el nivel de formación profesional con el 33,3% (5/15). También se dio asociación entre infección e información higiénica con el 95,8% (23/24) de infección en los participantes con un nivel bajo de información higiénica (p=0,001).

Se encontraron doce parásitos diferentes en los participantes de este grupo (Tabla VD- 16). La proporción de pacientes infectados con algún helminto patógeno fue del 60,0% (30/50), siendo los detectados: *Trichuris*, *Ascaris*, *Schistosoma* spp. y Uncinarias. La

proporción de pacientes infectados con algún protozoo patógeno fue del 48,0% (24/50), considerando como tales (Figura VD-11): *Entamoeba* spp. y *Giardia duodenalis*.



1: Quiste de *Giardia*; 2: Ooquistes de *Cryptosporidium*; 3: Quistes de *Entamoeba* spp.

**Figura VD-11:** Protozoos patógenos: *Giardia*, *Cryptosporidium* y *Entamoeba histolytica/dispar*.

La proporción de pacientes infectados con algún protozoo oportunista fue del 36,0% (18/50), incluyendo en este grupo: *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *Blastocystis hominis*, *E. nana* y *Chilomastix mesnili*.

Considerando el total de parásitos intestinales identificados en el grupo VIH negativos de la Isla de Bioko, el 45,9% (50/109) correspondían a helmintos patógenos, el 30,3% (33/109) a protozoos patógenos y el 23,8% (26/109) protozoos oportunistas.

Al igual que en el grupo de participantes VIH positivos de la Isla de Bioko, no se encontraron *Isospora* o *Cyclospora*, aunque fue más frecuente la infección por *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., y *Schistosoma intercalatum/guineensis*.

**Tabla VD-16:** Proporción de parásitos intestinales en pacientes VIH negativos. Isla/ Continente.

PARASITO	HIV- Isla (n= 50)	%IC	HIV- Continente (n= 60)	%IC
<i>T. trichiura</i>	21	42,0 (27,3 – 56,7)	30	50,0 (36,5 – 63,5)
<i>A. lumbricoides</i>	14	28,0 (14,5 – 41,4)	19	31,7 (19,0 – 44,3)
<i>S. stercoralis</i>	0	0	8	13,3 (3,9 – 22,7)
Uncinarias	5	10,0 (3,3 – 21,8)	4	6,7 (1,8 – 16,2)
<i>S. intercalatum/guineensis</i>	10	20,0 (7,9 – 32,0)	8	13,3 (3,9 – 22,7)
<i>Entamoeba</i> spp.	21	42,0 (27,3 – 56,7)	24	40,0 (26,8 – 53,2)
<i>Giardia duodenalis</i>	12	24,0 (11,1 – 36,8)	10	16,7 (6,4 – 26,9)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	10	20,0 (7,9 – 32,0)	1	1,7 (0,04 – 8,9)
<i>Entamoeba coli</i>	6	12,0 (2,0 – 22,0)	10	16,7 (6,4 – 26,9)
<i>E. nana</i>	3	6,0 (1,2 – 16,5)	11	18,3 (7,7 – 28,9)
<i>Blastocystis hominis</i>	2	4,0 (0,5 – 13,7)	1	1,7 (0,04 – 8,9)
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	4	8,0 (2,2 – 19,2)	3	5,0 (1,0 – 13,9)
<i>I. bütschlii</i>	1	2,0 (0,05 – 10,,6)	2	3,3 (0,4 – 11,5)
<b>TOTAL PARASITOS</b>	<b>109</b>		<b>131</b>	

La infección por *Trichuris* estuvo asociada con la edad, con una proporción de la infección en niños del 76,5% (13/17) [p<0,001, OR = 10,1 (2,6-40,1)], frente a un 24,2% (8/33) de adultos. Así mismo, se encontró asociación entre *Trichuris* y el nivel de información higiénica [p=0,003, OR=8,4 (2,3-30,6)], y entre *Trichuris* y el nivel de formación académica (p=0,025), siendo la infección mayor en los participantes con un nivel bajo de información higiénica, con un 76,2% (16/21); y en el nivel académico de formación primaria/nula, con un 61,9% (13/21). Hay que destacar que todos los casos de uncinariosis se han dado en el cinturón urbano.

Por otro lado, se encontró asociación entre la infección por *Schistosoma* y la edad [p=0,007 OR=7,0 (1,5-32,3)], ya que un 70,0% (7/10) de los participantes parasitados por *Schistosoma* spp. eran niños.

En el caso de los protozoos patógenos, la infección por *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp. y *Entamoeba coli* se relacionó con la edad [41,2% (7/17), p=0,041, OR=3,9 (1,0-15,2)], [64,7% (11/17), p=0,020, OR = 4,2 (1,2- 14,6)] y [83,3% (5/6), p=0,007, OR=13,3 (1,4-126)] siendo más frecuente la infección en el grupo de los participantes menores de 15 años. La infección por *Entamoeba* spp. se relacionó con el género, siendo más frecuente la infección en los varones, con un 60,0% (12/20) de infectados [p = 0,035, OR = 3,5 (1,0-11,5)].

En el caso de *Cryptosporidium* spp., la infección se encuentra relacionada con el nivel de información higiénica y de formación académica, de modo que sólo se ha encontrado

este parásito en participantes con niveles académicos de formación primaria/nula [90,0% (9/10)] o secundaria [10,0% (1/10)] y con niveles bajos o medios de información en normas de higiene, en las mismas proporciones. Además, igual que ocurría con los protozoos anteriores la infección por *Cryptosporidium* se asocia con la edad [ $p=0,007$ , OR = 7,0 (1,5-32,3)], con mayor frecuencia de infección en niños que representan el 70,0% (7/10) de los infectados por este protozoo.

En lo que respecta a coinfecciones, se encontró asociación entre la infección por *Trichuris* y las siguientes especies de parásitos: *Ascaris* ( $p=0,001$ ), *Entamoeba* spp. ( $p=0,003$ ), *Entamoeba coli* ( $p=0,002$ ) y con *Cryptosporidium* spp. ( $p=0,045$ ). En este grupo, también se dio asociación entre *Ascaris* y las siguientes especies parasitarias: *Entamoeba coli* ( $p=0,025$ ) y *Entamoeba* spp. ( $p=0,046$ ). Entre la infección por *Schistosoma intercalatum/guineensis* y Uncinaria ( $p=0,018$ ). Entre la infección por *Giardia duodenalis* y las especies: Uncinaria ( $p=0,047$ ), *Pentatrichomonas hominis* ( $p<0,001$ ). Así como entre *Entamoeba* spp. con: *Pentatrichomonas hominis* ( $p=0,014$ ) y con *Giardia* ( $p=0,008$ ).

### **Bata - Región Continental -**

El 86,7% (52/60) de los participantes de este grupo fueron positivos para al menos un parásito intestinal e, igual que en el grupo de participantes VIH positivos de esta región continental, la infección parasitaria intestinal fue más frecuente en los participantes de la zona urbana (Tabla VD-14).

La proporción total de participantes VIH negativos de la Región Continental parasitados (86,7%) ha sido mayor que en la Isla de Bioko (74,0%), así como la frecuencia de la misma en la zona rural y urbana; en cambio en la isla la zona de residencia donde se encuentran más pacientes parasitados es el cinturón urbano.

Se observó poliparasitismo en el 60,0% (36/60) de los componentes del grupo, con un rango de 0-8 parásitos y una media de parásitos por participante de  $2,18 \pm 1,70$  (Tabla VD-15). Sólo en un paciente se detectó la presencia simultánea de 8 parásitos, un varón adulto que residía en la zona urbana de Bata y que albergaba los siguientes parásitos: *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, *Entamoeba coli*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *E. nana*, *Ascaris lumbricoides*, *T. trichiura* y Uncinarias.

La proporción de poliparasitismo, así como el número de especies de parásitos encontrados son mayores en la Región Continental, aunque este hecho no se haya asociado a ninguna de las variables de estudio.

No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la infección y las distintas variables del estudio. En este grupo, 24 (40,0%) de los participantes presentaron síntomas intestinales y de ellos 21 (87,5%) estaban parasitados.

Se encontraron trece parásitos diferentes en los participantes de este grupo (Tabla VD-16). La proporción de pacientes infectados con algún helminto patógeno fue del 71,7% (43/60), habiendo detectado: *Trichuris*, *Ascaris*, *S. stercoralis*, *Schistosoma* spp. y *Uncinaria*. La proporción de pacientes infectados con algún protozoo patógeno fue del 46,7% (28/60), considerando como tales: *Entamoeba* spp. y *Giardia duodenalis*. El porcentaje de pacientes infectados con algún protozoo oportunista fue del 31,7% (19/60), incluyendo como oportunistas: *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba coli*, *I. bütschlii*, *Pentatrichomonas hominis*, *Blastocystis hominis*, y *E. nana*.

Por otra parte, considerando el total de parásitos intestinales identificados en el grupo VIH negativos de la Región Continental, el 52,7% (69/131) correspondían a helmintos patógenos, el 25,9% (34/131) a protozoos patógenos y el 21,4% (28/131) protozoos oportunistas.

Al igual que en el grupo VIH positivos de la zona continental, no se encontraron ni *Isospora* ni *Cyclospora*.

La infección por *S. stercoralis*, fue significativamente más frecuente en los participantes con nivel socioeconómico bajo o medio [75,0% (6/8)], respecto al alto [25,0% (2/8) (p=0,038)].

El porcentaje total de protozoos oportunistas ha sido mayor en la Isla de Bioko que en la región continental. Lo mismo ha ocurrido a nivel de especies, con mayor probabilidad de adquirir una infección por *Cryptosporidium* (p=0,0014) en los residentes de la Isla que en el continente.

En relación a la infección por *Giardia*, el 31,6% (6/19) de varones la presentaba, frente al 9,8% (4/41) de mujeres, dando una asociación significativa de la infección con el género [p =0,035, OR=4,2 (1,0-17,5)].

### 4.2.3 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos

Teniendo en cuenta la alta proporción de infecciones parasitarias intestinales presente en personas VIH positivas y los factores que influyen en la adquisición de las mismas, así como la coinfección con el VIH y el estado inmunológico, se seleccionaron y se incluyeron en el estudio 110 personas VIH negativas (50 procedentes de la Isla de Bioko y 60 de la Región Continental). Todas ellas convivían con alguno de los participantes VIH positivos que estaban parasitados. Estos pacientes se estudiaron con el objetivo de eliminar la influencia de factores medioambientales. Los datos de los 110 participantes VIH negativos fueron comparados con los de los 110 participantes VIH positivos que vivían con ellos.

#### Resultados de la Isla de Bioko

La probabilidad de parasitismo por *Ascaris*, Uncinarias y *Schistosoma* disminuye en un 39,1%, 27,3% y 43,2% respectivamente para el grupo de personas VIH positivas, mientras que la probabilidad de parasitismo por *Trichuris*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis*, *Pentatrichomonas* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y *Entamoeba* spp. fueron de un 59,9%, el 67,4%, 76,6%, 56,1%, 63,2%, 71,3% y 79,7% respectivamente. La tabla VD-17 muestra la OR entre el VIH y la coinfección parasitaria intestinal.

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Entamoeba* spp. y *Giardia* spp. y la infección por VIH ( $p=0,001$  y  $p=0,035$  respectivamente).

En este grupo, los participantes con diarrea fueron el 15,0% (15/100), apreciándose asociación entre infección parasitaria intestinal y diarrea en pacientes VIH positivos ( $p=0,002$ ), con mayor proporción de infección en este grupo [13 (86,7)] que en el grupo de participantes VIH negativos [2 (13,3%)].

Como resumen general, se describen en la figura VD-11 todos los resultados de los diferentes grupos de parásitos intestinales identificados en los pacientes procedentes de la Isla de Bioko y se señalan las cuencas más importantes asociadas a los mismos.

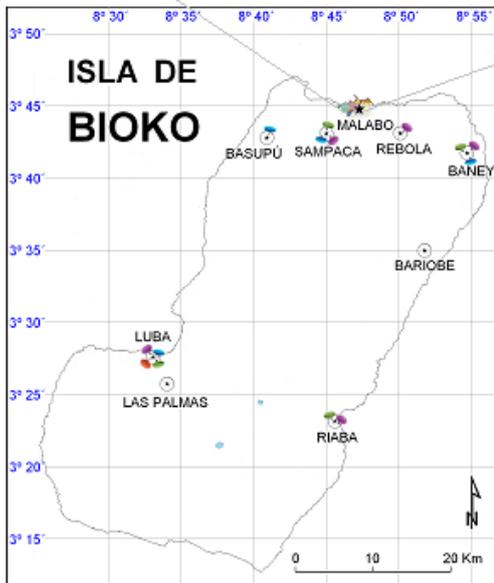
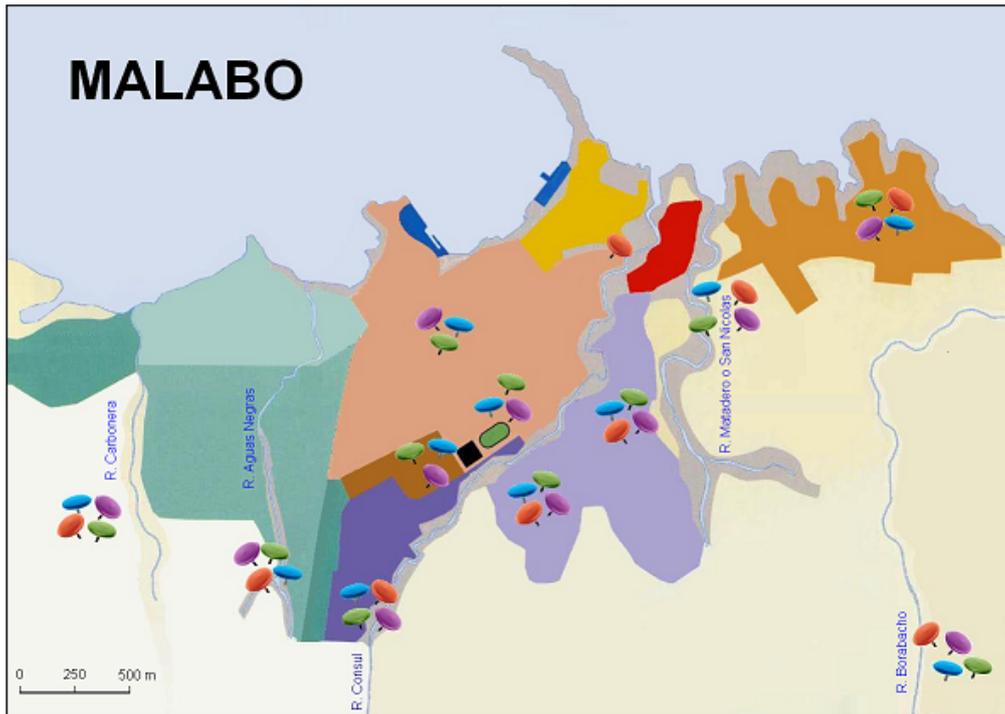


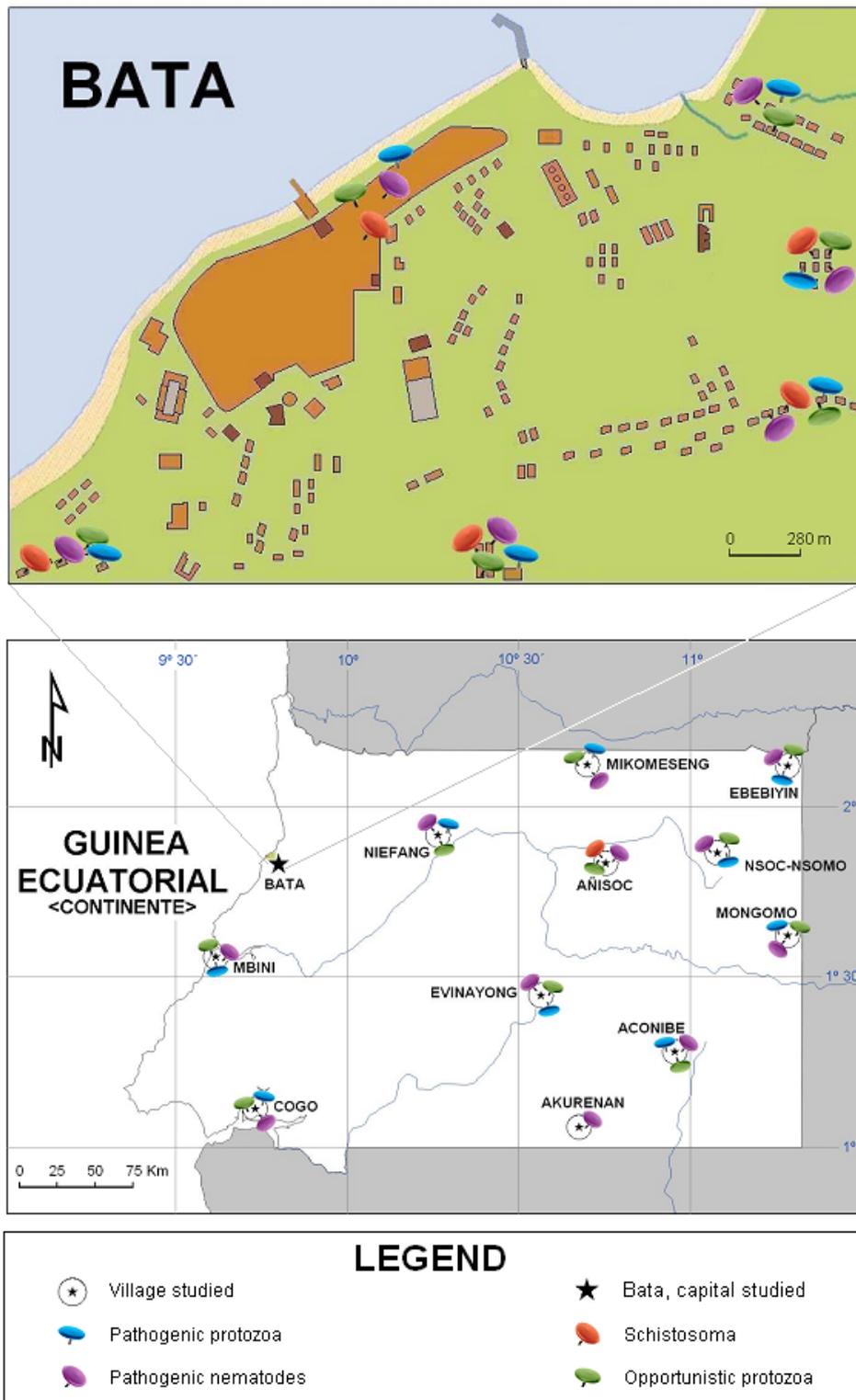
Figura VD-12: Mapa georeferenciado de los distintos grupos de parásitos intestinales. Isla de Bioko.

## Resultados de la Región Continental

La probabilidad de parasitismo por *Ascaris*, *Trichuris*, *Pentatrichomonas* spp., *Giardia* y *Schistosoma* disminuye en un 46,0%, 48,3%, 39,6%, 46,8% y 31,7% respectivamente, para el grupo de participantes VIH positivos, mientras que la probabilidad de parasitismo por *Blastocystis*, Uncinarias, *Cryptosporidium*, *E. nana* y *Entamoeba* spp. aumenta en un 88,6%, 56,0%, 80,8%, 76,0% y 91,9% respectivamente. La tabla VD-17 muestra la OR para la coinfección entre VIH e infección parasitaria intestinal.

Además, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Entamoeba* spp., *Blastocystis* y *E. nana* e infección por VIH ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,028$  y  $p = 0,005$  respectivamente).

Como resumen general, se describen en la figura VD-12 todos los resultados de los diferentes grupos de parásitos intestinales identificados en los pacientes procedentes de la Región Continental y se señalan las cuencas más importantes asociadas a los mismos.



**Figura VD-13:** Mapa georeferenciado de los distintos grupos de parásitos intestinales. R. Continente.

**Tabla VD-17:** OR para VIH+ e infección parasitaria, tomando como referencia VIH negativo. Isla de Bioko/R. Continental.

PARÁSITO	ISLA BOKO			R. CONTINENTAL		
	OR	IC95%	%	OR	IC 95%	%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0,643	0,254-1,626	39,1	0,853	0,390-1,864	46,0
<i>Trichuris trichiura</i>	1,496	0,679-3,294	59,9	0,935	0,457-1,914	48,3
Uncinarias	0,375	0,069-2,031	27,3	1,273	0,325-4,991	56,0
<i>Schistosoma</i> spp.	0,762	0,273-2,125	43,2	0,464	0,132-1,634	31,7
<i>Entamoeba coli</i>	2,068	0,700-6,116	67,4			
<i>Blastocystis hominis</i>	3,273	0,627-17,071	76,6	7,792	0,928-65,433	88,6
<i>Pentatrichomonas h.</i>	1,278	0,322-5,066	56,1	0,655	0,106-4,069	39,6
<i>Giardia duodenalis</i>	2,488	1,057- 5,857	71,3	0,882	0,331-2,354	46,8
<i>Entamoeba</i> spp.	3,930	1,688-9,154	79,7	11,357	4,426-29,143	91,9
<i>E. nana</i>				3,182	1,386-7,306	76,0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1,714	0,683-4,301	63,2	4,214	0,457-38,865	80,8



***DISCUSIÓN DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS***

---



## **5. DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES**

Se ha realizado en Guinea Ecuatorial un estudio transversal, de reclutamiento continuo, para determinar la proporción de parásitos intestinales en pacientes VIH positivos, analizando las posibles asociaciones entre especies y/o genotipos detectados con las variables sociodemográficas y clínicas de las personas participantes.

Hasta donde conocemos, solo se han realizado en el país dos estudios centrados en la prevalencia de parásitos intestinales. El primero fue llevado a cabo por Roche y Benito hace más de diez años (Roche & Benito, 1999), con participantes de la Isla de Bioko, en el que no se diferenciaba el estado serológico de los participantes frente al VIH. El segundo, más reciente, se centró en pacientes VIH positivos de la Isla de Bioko y de Bata. Fue realizado por Fuentes *et al.* en 2007. Ambos estudios investigan la prevalencia de las parasitosis intestinales, sin entrar a evaluar la influencia de las condiciones sociodemográficas y clínicas de los participantes en la adquisición de las mismas.

### **5.1 Concentración de la muestra vs visión en fresco**

En Guinea Ecuatorial, cuando se realiza un análisis parasitológico de heces, habitualmente no se realizan técnicas de concentración, ya que no suele haber medios disponibles, realizando, por tanto, la visión en fresco. Por ello, resultó interesante evaluar la diferencia en los resultados que se obtienen con ambos métodos de procesamiento de las muestras, que nos indique de una forma aproximada las desviaciones que existen en el diagnóstico habitual de estas infecciones.

Como era de esperar, las posibilidades de detectar parásitos en muestras de heces se multiplicaron mediante el uso del método de concentración, demostrando que se trata de un factor importante junto con las capacidades técnicas y la experiencia del observador, en el diagnóstico parasitológico. Sabiendo que un resultado en la visión directa depende del azar y principalmente del número y concentración de elementos parasitarios presentes en el material observado, la concentración aumenta la sensibilidad de la

observación cuando el número de parásitos es escaso y por tanto éstos puede escapar a la detección en el examen directo (Salvatella & Eirale, 1996).

Por otro lado, es posible que la proporción de la infección real por *Strongyloides stercoralis* se encuentre subestimada porque las larvas rhabditoides fueron detectadas en heces frescas y concentradas, pero no fue posible llevar a cabo su cultivo en el laboratorio inmediatamente después de la toma de muestras en Guinea Ecuatorial (Bergquist *et al.*, 2009). Lo mismo ocurre con algunos protozoos, especialmente en el caso de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. al no disponer de técnicas de tinción de Ziehl-Neelsen modificado. Por ello, para el cribado inicial de *Cryptosporidium* se utilizó la técnica de inmunocromatografía rápida (ICR). La técnica utilizada incluye, además, la detección de *Entamoeba* y *Giardia*. Fue evaluada en lo que respecta a su sensibilidad y especificidad en trabajos previos que concluyeron que en el caso de *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba* spp., las muestras positivas deben ser confirmadas por otras técnicas como la visualización microscópica o técnicas de biología molecular (Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2011; Chalmers *et al.*, 2011; Goñi *et al.*, 2012).

## **5.2 Identificación de parásitos por observación microscópica y técnica de detección de antígenos por inmunocromatografía rápida**

La proporción encontrada de pacientes VIH positivos con parásitos intestinales ha sido muy alta (81,5% en la Isla de Bioko y 76,9% en la Región Continental). En un estudio reciente realizado en el país por Fuentes *et al.* (2007) con 153 pacientes VIH positivos, la prevalencia de parasitosis intestinal alcanzó el 58,8%, un valor muy por debajo de los encontrados en el presente estudio. Es posible que algunos factores puedan explicar estas diferencias: el número de muestras analizadas, el hecho de que en este estudio las muestras se analizaron inmediatamente tras su recogida, siendo además revisadas por triplicado, y posteriormente en la Universidad de Zaragoza tras la concentración.

Los resultados obtenidos también arrojan cifras muy superiores a los encontrados en otros estudios en el continente africano. Por ejemplo, en Camerún la prevalencia global de parásitos intestinales en pacientes VIH positivos fue del 33,0% (Sarfaty *et al.*, 2006); en Etiopía del 59,8% según estudio de Assefa *et al.* (2009) o incluso del 69,2% según estudio de Miriam *et al.* (2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio que nos ocupa son más acordes con los encontrados por Babatunde *et al.* en Nigeria, donde

el 87,8% de los pacientes VIH positivos estudiados estaban infectados por parásitos intestinales (Babatunde *et al.*, 2010).

La alta proporción de infecciones parasitarias intestinales y las diferencias entre países, sugieren la presencia de factores ambientales que contribuyen a la propagación de los parásitos, tales como el hacinamiento poblacional, las condiciones socioeconómicas y sanitarias, la posible contaminación del agua o carencia de agua potable y los hábitos de la población. Por esta razón, se planteó el análisis de parásitos intestinales en participantes VIH negativos que vivieran en el entorno de los VIH positivos, de forma que la influencia de algunos de los factores ambientales se eliminara como variable. Con esta premisa, se incluyó un grupo de 110 participantes VIH negativos (50 de la Isla de Bioko y 60 de la Región Continental), residentes en la misma casa de alguno de los participantes VIH positivos que tuviera alguna infección parasitaria intestinal de transmisión persona a persona.

Los resultados obtenidos en los participantes VIH negativos fueron muy similares a los encontrados para los VIH positivos, aunque en el caso de los VIH negativos, la proporción de los participantes infectados fue mayor en la Región Continental que en la Isla de Bioko (86,7% y 74,0% respectivamente). Estos valores también son superiores a los encontrados en otros países africanos, como Etiopía con un 48,8% (Assefa *et al.*, 2009) y un 56,9% (Mariam *et al.*, 2008) o similares a los encontrados en Nigeria (74,0%), proporción similar a la encontrada en la Isla de Bioko (Babatunde *et al.*, 2010).

Cuando se analizó la distribución de la infección parasitaria intestinal por área de residencia, los resultados obtenidos para los participantes de la Isla de Bioko mostraron frecuencias de parasitación algo inferiores a las obtenidas por Roche y Benito (1999) (71,8% de la población rural frente a 75,1% en los pacientes del Hospital de Malabo). Hay más de una década de diferencia entre los dos estudios, y ahora, debido a la tendencia de la gente a agruparse alrededor de las ciudades, la proporción de participantes de las zonas rurales ha disminuido. En la década de diferencia que hay entre los dos estudios, la distribución de la población se ha modificado, con migraciones desde la zona rural hacia las ciudades, que han tenido como consecuencia un hacinamiento de la población con menos recursos en los cinturones urbanos y la despoblación de las áreas rurales, lo que se traduce en un menor número de participantes de esta área. Por ello, en el presente estudio se añadió una tercera categoría

de lugar de residencia, el cinturón urbano. El cinturón urbano de Malabo es una de las zonas con más población debido no sólo a la inmigración interna de la zona rural a la urbana y del continente a la isla, sino también a la llegada de inmigrantes desde los países vecinos en busca de empleos, con mejores condiciones laborales en las empresas extractivas del petróleo y del gas. En esta zona se mantienen niveles muy bajos de higiene ambiental, mientras que los habitantes de las zonas rurales suelen mostrar más respeto por las condiciones sanitarias cuidado de la distancia de separación entre las casas, letrina y/o aseo en cada hogar, lugares cercados fuera del poblado para los animales (aunque en la región continental los animales sigan conviviendo con las personas) y una adecuada limpieza del medio ambiente.

En la Isla de Bioko, la población rural cuenta con grifos públicos a los que nunca les falta agua y, aunque el agua no llegue a su casa, no desarrolla el hábito de la vida en el río. Por el contrario, en la región continental, aunque se disponga de un pozo público, hay una arraigada costumbre de vivir en torno a los ríos.

Lo expuesto hasta ahora podría explicar el haber encontrado una menor prevalencia de parasitosis en las zonas rurales frente a las más altas encontradas en la zona urbana y en el cinturón urbano de las ciudades de Malabo y Bata.

La ciudad de Malabo dispone de depósitos de agua desde donde ésta es suministrada a la red que llega a los hogares. Estos depósitos reciben el agua directamente del río, sin que haya sistemas de depuración o de potabilización ni en Malabo ni en el resto del país.

Probablemente debido a los altos índices de parasitismo, en ninguna de las dos regiones estudiadas se han encontrado diferencias estadísticas significativas entre parasitación en los participantes VIH positivos y VIH negativos. Sí que se obtuvo asociación entre parasitación y lugar de residencia para los participantes VIH positivos, así, en la región Insular, se aprecia un mayor número de participantes VIH positivos infectados en el cinturón urbano y en la región continental se aprecia solo una tendencia, debido a una tasa más alta de participantes parasitados en el medio rural. Esta relación se mantiene para los VIH negativos de la isla, mientras que en la región continental, la proporción de participantes VIH negativos parasitados que residen en el medio urbano, supera a los parasitados residentes en el cinturón urbano, aunque no se obtiene asociación

significativa. Además, en esta última región se observa una considerable diferencia entre la proporción de parasitados VIH negativos (7,7%) y VIH positivos (24,3%) residentes en el medio rural, diferencia mucho mayor a la observada entre los dos grupos en la Isla de Bioko. Esta observación puede sugerir que en el continente se dé una menor influencia de factores medioambientales y una mayor influencia de la coinfección con el VIH a la hora de adquirir infecciones parasitarias intestinales, aunque también hay que tener en cuenta que en esta región, las personas VIH positivas tienden a volver a sus poblados natales -zona rural- en busca de una mejora de su estado de salud, cuando se diagnostica la seropositividad o entran en proceso de SIDA. Este hecho podría justificar igualmente la elevada proporción de participantes, así como de infección parasitaria intestinal, de los pacientes VIH positivos de la zona rural.

Otro resultado que llama la atención es que en el medio urbano, la proporción de participantes parasitados es mayor en los participantes VIH negativos (55,8%) que en los VIH positivos (30,5%). Una posible explicación es que cada tres meses, sin análisis parasitológico previo, se administra albendazol y/o mebendazol así como metronidazol, a personas seropositivas en los controles rutinarios de seguimiento en la UREI y CTA de la Región Continental y cotrimoxazol en la Región Insular, lo que redundaría en la disminución de los parásitos en los pacientes VIH positivos. El que esto no ocurra en las otras zonas estudiadas podría estar relacionado con una accesibilidad menor de los participantes rurales y del cinturón urbano a las unidades de control, tanto por cuestiones de distancia como sociales.

Como consecuencia de las altas tasas de parasitismo encontradas, apareció poliparasitismo, con combinación de hasta 7 especies de parásitos en la Isla de Bioko, más común en los niños del grupo VIH negativos, y de 8 en el continente, más frecuente en los adultos VIH positivos. No ha habido diferencias significativas en las proporciones de poliparasitación en las dos regiones del país. Sin embargo, la zona más afectada en la isla fue el cinturón urbano de Malabo y en Bata lo fue la zona urbana seguida del cinturón urbano.

Cuando se analizan los factores que influyen en la infección parasitaria intestinal, se observa, como dato destacado, que para los participantes VIH positivos, en Bioko no se ha encontrado asociación entre estado inmunológico e infección parasitaria intestinal, pero sí en el continente, de acuerdo con algunos estudios que sugieren que el bajo

recuento de células T-CD4 + se relaciona con una mayor incidencia de infecciones parasitarias oportunistas (Certad *et al.*, 2003).

En la región continental, la proporción de parasitación intestinal fue mayor en los participantes sin TARV que en los que estaban bajo TARV. El inicio del TARV por los pacientes es mucho más tardío en esta zona, por lo que es mayor el número de personas con necesidad de tratamiento antirretroviral de los que estaban recibiendo, aunque en el seguimiento sí recibieran tratamiento con antihelmínticos y antiprotozoarios lo que puede tener una gran influencia en la disminución de parásitos intestinales.

Pocos participantes informaron de síntomas clínicos como diarrea, malestar abdominal, o vómitos. En la isla, la falta de asociación entre la infección parasitaria en los participantes VIH positivos y los síntomas se justifica debido a que sólo el 48,8% (127/260) de los participantes informaron de síntomas, y de ellos, 103 estaban parasitados. No se encontró asociación entre los diferentes parásitos, considerando cada especie de forma individual, y la presencia de síntomas. Por el contrario, en el continente el 61,9% (169/273) de participantes señaló síntomas, 133 de los cuales se encontraban parasitados. Sin embargo, en este caso sí se encontró asociación entre infección por *E. histolytica/dispar/moshkovskii* y *Entamoeba coli* con otros síntomas, que incluyen molestias abdominales, dolor epigástrico o vómitos. Estos resultados, junto con las altas tasas de parasitación sugieren que el contacto permanente con los parásitos podría dar lugar a infecciones asintomáticas. Esta observación estaría de acuerdo con la opinión expresada por diversos autores de que la mayoría de las personas infectadas por *Strongyloides* que viven en zonas endémicas sean asintomáticas (Segarra-Newnham, 2007), y con la difusión de los genotipos asintomáticos de algunos parásitos como *Giardia* (Sahagún *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2010). Sin embargo, en personas VIH positivas de la isla, el estado inmunológico se asoció con diarrea pero no con parasitación intestinal específica. Por ello, que resulta de especial interés la determinación de las especies y los genotipos circulantes de algunos parásitos que nos permita asociarlos con síntomas más o menos específicos. Por otro lado, algunos pacientes no parasitados han informado de síntomas, lo que sugiere la posible presencia de otros agentes causales, tales como virus o bacterias que no han sido analizados en este estudio.

El número de especies parasitarias encontradas ha sido muy similar en todas las zonas y los grupos de población estudiados, siendo ligeramente superior en los participantes VIH positivos.

La proporción total de helmintos patógenos ha sido muy similar en la Región Continental [60,7% (202/333)] y en la Isla de Bioko [61,9% (192/310)]. En los pacientes VIH negativos, los helmintos más frecuentes fueron *Trichuris*, *Ascaris* y *Strongyloides* en el continente y *Uncinarias*, *Ascaris* y *Schistosoma* en la isla.

En el presente estudio, en la Isla de Bioko *Trichuris trichiura* fue significativamente más frecuente en los pacientes VIH positivos aunque en el grupo de los participantes VIH negativos la proporción encontrada fue también alta, con asociación entre la infección por *Trichuris* y la edad. En el primer grupo, sólo los adultos estaban infectados, pero estos resultados deben considerarse con precaución, debido al bajo número de niños en este grupo. En los VIH negativos, la asociación entre infección por *Trichuris* y edad dio como resultado una mayor proporción de infección en los niños, hecho justificado por su contacto con el suelo y la escasez de medidas higiénicas, lo que también está relacionado con el hecho de que la parasitación por *Trichuris* aparezca asociada a participantes con niveles académicos bajos. De acuerdo con lo comentado, la infección por *Trichuris* es más alta en el cinturón urbano, donde se acumulan las personas más desfavorecidas, con peores condiciones higiénicas y menores posibilidades económicas. En el continente encontramos asociación de la infección por *Trichuris* con el género, siendo más frecuente la infección en las mujeres que son las que más trabajan en el campo. También se da asociación con los niveles bajos de formación académica, el estatus socioeconómico y la inmunosupresión.

Por el contrario, en Bioko *Ascaris* fue significativamente más frecuente en el grupo de participantes seronegativos. También fue alta la proporción de pacientes VIH positivos (19,2%) que presentaban este helminto. Se ha encontrado asociación entre la infección por *Ascaris* y el género en el grupo de VIH positivo, lo que sugiere que, como ocurre en el caso de *Trichuris*, las actividades diarias llevadas a cabo por la mujer en el campo, la venta de los productos agrícolas en el mercado, los hábitos sociales e higiénicos, las precarias condiciones sanitarias del medio ambiente o el consumo de alimentos contaminados puedan ser la causa de la mayor parasitación en mujeres.

En diversas publicaciones, algunos autores describen cómo la alta proporción de parásitos intestinales va asociada a niveles socioeconómicos bajos, a lugares donde el suministro de agua es inadecuado y en general, a situaciones sanitarias deficientes (Assefa *et al.*, 2009; Damen *et al.*, 2011). Sin embargo, las actividades ocupacionales también podrían ser un factor de riesgo importante, especialmente entre los agricultores que están en continuo contacto con la tierra contaminada e incluso entre los comerciantes, a los que les gusta humedecer los dedos con saliva para contar el dinero (Hailemariam *et al.*, 2004) y cuyos lugares de trabajo no siempre reúnen las condiciones sanitarias mínimas. Por lo tanto, la asociación entre la infección parasitaria intestinal, el nivel de educación y de información en medidas higiénicas, así como, en menor medida, el lugar de residencia, no ha de sorprendernos ya que estos factores están interrelacionados, de modo que aquellas personas con menores niveles de educación también tienen menos cuidado con el saneamiento y tienden a vivir a su vez en el cinturón urbano.

Roche y Benito en 1999, también señalan a *Trichuris* y *Ascaris* como los nematodos intestinales más frecuentes y a *E. histolytica/dispar* como el protozoo más común en heces de los habitantes de la Isla de Bioko (Roche & Benito, 1999).

En Bioko, *Strongyloides stercoralis* fue detectado sólo en pacientes coinfectados con el VIH, mientras que *Cryptosporidium* y *Schistosoma* casi duplicaron su frecuencia en el grupo de los participantes VIH negativos. En el continente, la proporción de participantes que presentaban estas parasitosis fue casi similar en los dos grupos y aparecieron asociados a personas con nivel socioeconómico bajo en el grupo de los VIH negativos. La frecuencia de infecciones debidas a *Strongyloides* se ha incrementado dramáticamente en los últimos años, desde el 0,8% de participantes que presentaron esta parasitosis, según el estudio de Roche y Benito, hasta el 8,8% en la Isla de Bioko y el 10,8% en el continente, según los resultados obtenidos en el presente trabajo. Para explicar este aumento, es necesario tener en cuenta que en el estudio de Roche y Benito no se incluyeron participantes VIH positivos, colectivo en el que el parásito aparece con más frecuencia. Cabe señalar que el cultivo de heces proporcionaría un mayor número de positivos para *Strongyloides* (Joshi *et al.*, 2002), técnica que, como ya se ha comentado anteriormente, no se ha podido realizar por la falta de medios en el país de origen de los participantes en el estudio. La pobreza, la falta de acceso a agua potable, la falta de saneamiento ambiental, la exposición agrícola, el hacinamiento, la escasez de

hábitos de higiene, el nivel educativo bajo y el estado inmunológico están bien descritos como factores de riesgo para la infección por helmintos de transmisión a través del suelo (Olsen *et al.*, 2001; Dumba *et al.*, 2008).

Otro parásito cuya frecuencia ha sufrido marcadas diferencias en la última década es *Schistosoma intercalatum/guineensis*, que en los primeros estudios aparecía como causante de esquistosomosis endémica en la región continental (Simarro *et al.*, 1991; Simarro *et al.*, 1993; Jusot *et al.*, 1997; Roche & Benito, 1999), lo que dio lugar a que se llevaran a cabo campañas de tratamiento poblacional para el control de la endemia. Lo sorprendente es que en la actualidad, la infección causada por este parásito se encuentra en la Isla de Bioko con una frecuencia elevada (10,9%) y afectando a personas que nunca han salido de ésta, por lo que se descarta que hayan adquirido la infección en otro lugar. Esto sugiere que la inmigración de personas desde la región continental o desde otros países vecinos, motivada fundamentalmente por el auge del petróleo ha introducido el parásito en la Isla. No obstante, la observación de las características morfológicas de los huevos no permite asegurar si la especie presente es *S. intercalatum*, *S. guineensis*, una mezcla de ambos o un híbrido (Figura DVD-1), por lo que serán necesarias investigaciones futuras donde se utilicen técnicas de biología molecular para clarificar esta cuestión.



**Figura DVD-1:** Huevos de *Schistosoma* spp.

En el grupo de participantes VIH negativos, la esquistosomosis se encuentra principalmente en niños con poca información higiénica, mientras que entre los pacientes VIH positivos, existió asociación entre parasitación por *Schistosoma* y el género, con una proporción mayor de mujeres parasitadas que de varones. En el contexto donde viven los participantes del estudio, son los niños y las mujeres los que

más tiempo pasan en los ríos, ya que en ellos realizan las actividades de recogida de agua, lavado de vajilla y ropa así como de juego, en el caso de los niños (Figura DVD-2). En la región continental, la frecuencia de la infección fue menor que la encontrada en la Isla de Bioko y similar en los dos grupos de participantes estudiados. En este caso, se observó asociación con el lugar de residencia, siendo mayor la frecuencia en el cinturón urbano, donde la vida se desarrolla principalmente en los ríos. En uno de los estudios realizados en la región continental en 1997, se concluyó que la sospecha de SIDA era un factor de riesgo importante en la adquisición de la esquistosomosis, encontrando también asociación entre la carga parasitaria y los síntomas (Jusot *et al.*, 1997). Esto explicaría la ausencia de síntomas en el presente estudio, debido a la baja carga parasitaria observada en casi todos los casos. En el estudio de Jusot *et al.* citado se subraya además la ausencia de síntomas cuando el contacto con el parásito es continuo. La menor frecuencia de la infección en la región continental respecto a la insular se puede explicar debido al tratamiento en masa con prazicuantel que se llevó a cabo en la población de Bata y que logró reducir la infección en la población en un 98,9% (Simarro *et al.*, 1991).



**Figura DVD-2:** Río Borabecho, barrio Fishtown (Elá Nguema). Isla de Bioko.

La frecuencia total de protozoos patógenos, así como de las diferentes especies consideradas de modo individual, ha sido mayor en la Isla de Bioko que en la Región Continental, con un 47,8% de participantes infectados en el primer caso frente al 39,6% en el segundo caso. Lo mismo ocurre con los protozoos no patógenos, la frecuencia fue mayor en la población de Bioko que en la del continente (35,2% y 33,9% de pacientes infectados, respectivamente). Este resultado se interpreta considerando que la mayor frecuencia de protozoos en Bioko es debida al hacinamiento en que vive la población de la ciudad de Malabo, sobre todo, en el cinturón urbano.

En la Isla de Bioko, la proporción de participantes VIH negativos que presentaron protozoos patógenos (48,0%) fue similar que la de los participantes seropositivos (47,7%), al igual que los helmintos patógenos (62,3%) en los participantes VIH positivos y el 60,0% en los VIH negativos.

En el continente, la frecuencia de helmintos patógenos fue mayor en los participantes VIH negativos, con una proporción de 71,7% parasitados, comparada con la de los VIH positivos infectados (58,2%). Lo mismo ha ocurrido para la frecuencia de protozoos patógenos el 46,7% de VIH negativos y el 38,1% de VIH positivos presentaban protozoos patógenos; en cambio, para los protozoos oportunistas la proporción ha sido ligeramente mayor en los participantes VIH positivos (34,4%) que en los VIH negativos (31,7%), este hecho puede ser debido, a la tendencia a retardar el TARV en los pacientes que lo necesitan en la UREI de Bata.

Los estudios realizados en otros países africanos también describen una mayor proporción de helmintos intestinales que de protozoos en pacientes VIH positivos (Hailemariam *et al.*, 2004). Este hecho no se ha podido demostrar en la región continental.

La frecuencia de la infección por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* observada en este estudio fue mayor (42,0% y 43,0% de los participantes VIH negativos y VIH positivos respectivamente) en la Isla de Bioko que la encontrada por Roche y Benito en 1999 (32,7%) y posteriormente por Fuentes *et al.*, en 2007 (9,8%). En el grupo de participantes VIH negativos, se asoció con la edad y con el género y en el grupo de participantes VIH positivos con el lugar de residencia. También fue mayor que en los estudios anteriores la frecuencia encontrada en la región continental, ya que el 37,0% de

los participantes VIH positivos y el 40,0% de los VIH negativos presentaron infección por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, existiendo asociación entre infección y otros síntomas, niveles bajos de información higiénica y de formación académica, así como el no estar bajo TARV en el grupo de los VIH positivos. De igual manera, en este grupo, *Entamoeba coli* se asoció a otros síntomas. Una vez más, las altas tasas de infección observadas y las asociaciones encontradas, sugieren que la diseminación de la infección por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* y por *Entamoeba coli* se encuentra relacionada con las deficientes condiciones sanitarias de la población. No obstante, y considerando la diferente patogenicidad de estas especies, resulta necesario utilizar técnicas de biología molecular para determinar la distribución de las especies de *Entamoeba*, diferenciando la patógena *E. histolytica* de especies no patógenas tales como *E. dispar* o la recientemente descrita *E. moshkovskii* y estudiar su posible relación con diarrea o con otros síntomas y con el estado inmunológico de los participantes.

En el estudio que presentamos, *Giardia duodenalis* se detectó con frecuencias similares a las reportadas en los estudios de 1999 y 2007, en los pacientes VIH positivos (Roche & Benito, 1999; Fuentes *et al.*, 2007), pero casi la frecuencia de este flagelado se duplica en el grupo de los participantes VIH negativos en la Isla de Bioko. En el continente, en el grupo de los VIH negativos casi se triplicaron los valores.

En otros países africanos como Nigeria, Zambia y Tanzania, la proporción de infección por *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, *Giardia* y *Cryptosporidium* fue mayor en pacientes VIH positivos (Hunter *et al.*, 1992; Gómez-Morales *et al.*, 1995; Babatunde *et al.*, 2010). De acuerdo con varios autores, *Giardia* y *Cryptosporidium* son parásitos que preferentemente se encuentran en niños y en los países en desarrollo la criptosporidiosis es más prevalente en niños menores de 2 años de edad (Valentiner-Branth *et al.*, 2003; Mor & Tzipori, 2008; Xiao & Fayer, 2008; Xiao, 2010).

Por lo tanto, el bajo número de niños en el grupo de participantes seropositivos, puede ser la causa de las diferencias en la proporción de infección que se da en la asociación entre *Cryptosporidium* y la edad en el grupo de pacientes VIH negativos de Bioko. Otros autores han publicado una relación entre el estado inmunológico y la infección por protozoos, y específicamente por *Cryptosporidium* (Ramana & Mohanty, 2009), que en nuestro caso no se ha confirmado. Estos autores ponen también de manifiesto los efectos de los ARV inhibidores de la proteasa del VIH sobre la infección por

*Cryptosporidium*, que pueden llegar a modificar la epidemiología de estos protozoos intestinales y que a su vez, pueden ser componentes clave de la terapia en el estado de SIDA. No está muy claro si el efecto se debe a la reconstitución inmune o a efectos antiparasitarios de estos inhibidores (Cabada & White, 2010). Otros estudios señalan que este grupo de ARV, que en principio ayudan a la reducción de la carga viral y la recuperación de las células CD4+, permiten la recuperación clínica y la erradicación de la infección por *Cryptosporidium* (Maggi *et al.*, 2000; Miao *et al.*, 2000) y que son en la actualidad la terapia de elección para esta parasitosis pudiendo ser usados también como profilaxis (Cacciò & Pozio, 2006).

La infección por *Giardia* se asoció con el género en el grupo de participantes VIH negativos del continente, siendo más frecuente en los varones.

La asociación entre criptosporidiosis y el nivel socioeconómico en los pacientes VIH positivos de Bioko, nos lleva a pensar que un nivel adquisitivo bajo conduce a vivir en lugares donde las condiciones sanitarias son deficientes y esto favorece la adquisición de la infección. En el primer estudio llevado a cabo en la Isla de Bioko, (Roche & Benito, 1999) no se realizaron las técnicas necesarias para la detección de este protozoo, pero en 2009, Blanco *et al.*, encontraron un 14,9% (7/47) de parasitación en una muestra de pacientes VIH positivos de Malabo y en Bata un 20,3% (28/138) (Blanco *et al.*, 2009), valor superior al encontrado en nuestro estudio (9,2% en Malabo y 2,9% en Bata), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa posiblemente, debido a la diferencia en el tamaño de la muestra estudiada.

El hecho de que se administre de forma regular *cotrimoxazol* a las personas VIH positivas puede justificar la ausencia de *Isospora* spp. y *Cyclospora* spp. *Blastocystis hominis*, cuya patogenicidad se encuentra en entredicho, y los claramente no patógenos *Chilomastix*, *E. nana*, *Entamoeba coli*, *E. hartmanni* e *I. bütschlii* fueron identificados también en el estudio de Roche & Benito (1999), aunque en una proporción mucho menor a la encontrada en nuestro estudio. En el continente, estos parásitos se asociaron al TARV, siendo su frecuencia mayor y significativa en los pacientes que no estaban bajo TARV. *Pentatrichomonas* se asoció con diarrea. Aunque estos parásitos no sean patógenos, es importante determinar su proporción, ya que puede ser un buen indicador de referencia de las condiciones higiénicas de la población, de la calidad del agua de uso doméstico, del tratamiento de los alimentos, etc. Esto nos lleva a subrayar la

importancia de potenciar las actividades encaminadas a la educación para la salud en la población en general y en particular en las PVVIH.

Se encontró una asociación entre la infección por *Trichuris* y *Ascaris*, *Entamoeba* spp. y *Blastocystis*, así como *Entamoeba* spp. y *Giardia* en el grupo de participantes VIH positivos de las dos regiones. En el grupo de participantes VIH negativos de Bioko se dio la asociación con *Cryptosporidium* spp. y entre *Trichuris* con *Ascaris* y *Entamoeba* spp. y entre *Giardia* y *Entamoeba* spp. entre otras. Estas asociaciones sugieren una participación importante de la ruta hídrica en la transmisión de las enfermedades parasitarias intestinales. Este hecho quedó confirmado cuando los datos de las personas VIH positivas y VIH negativas que convivían en el mismo hogar, mostraron que las infecciones por *Ascaris*, *Schistosoma* y Uncinarias, no se asociaron con la coinfección por el VIH en Bioko. Lo mismo sucedió con las infecciones por *Ascaris*, *Trichuris* y *Schistosoma* en el continente, siendo el porcentaje de parasitismo más alto en personas VIH negativas. Estos resultados sugieren que la infección parasitaria intestinal podría estar relacionada con otros factores como las diferencias en las actividades que desempeñan la mujer y el varón, o un adulto y los niños. Además, debe tenerse en cuenta que la correlación entre la disminución de las tasas de excreción de huevos de *Schistosoma* y los niveles bajos de las células T-CD4+ ha sido puesta de manifiesto (Harms & Feldmeier, 2002). Este es un hecho que dificulta el diagnóstico de la esquistosomosis. En nuestro caso se encontró una concentración baja de huevos de *Schistosoma* tanto en el grupo de participantes VIH positivos y como en el de VIH negativos.

Cuando se han comparado los resultados obtenidos para las personas VIH positivas y VIH negativas que residían en la misma casa, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la infección por el VIH y la infección por *Entamoeba* spp. y *Giardia duodenalis*; por la que las personas VIH positivas tienen mayor riesgo de adquirir infecciones parasitarias por *Entamoeba* spp. *Giardia duodenalis*, *Trichuris*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis*, *Pentatrichomonas* spp y *Cryptosporidium*, siendo este riesgo significativamente mayor que en las personas VIH negativas en la Isla de Bioko. Sin embargo, en el continente la asociación fue significativa entre la infección por el VIH y la infección por *Entamoeba* spp, *E. nana* y *Blastocystis*. Las personas VIH positivas tienen mayor riesgo de adquirir infecciones parasitarias por *Entamoeba* spp. *Blastocystis*, *E. nana*, Uncinaria y *Cryptosporidium*

siendo este riesgo significativamente mayor que en las personas VIH negativas. Otros estudios han sugerido que la mayor probabilidad de adquirir infecciones por parásitos patógenos, como las producidas por *Giardia*, *Entamoeba* spp. y *Strongyloides*, así como su alta prevalencia en personas VIH positivas (Robinson *et al.*, 1990; Feitosa *et al.*, 2001; Awole *et al.*, 2003; Babatunde *et al.*, 2010), pueden ser debidas a continuas re-infecciones que disminuyen la capacidad de aclaramiento de estos parásitos en las personas seropositivas (Awole *et al.*, 2003).

Los resultados que presentamos muestran la importancia de la transmisión de las enfermedades parasitarias intestinales por vía hídrica y alimentaria, así como de la educación sanitaria de la población. También se pone de manifiesto que algunas de las enfermedades causadas por estos parásitos tienen una especial incidencia en los pacientes VIH positivos, en quienes pueden llegar a ser crónicas, reduciendo notablemente su calidad de vida y llegar a causarles la muerte (Hailemariam *et al.*, 2004; Mariam *et al.*, 2008; Assefa *et al.*, 2009), por lo que reviste especial importancia la adopción de medidas destinadas a su control.



*CONCLUSIONES DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS*

---



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS INTESTINALES

### 6.1 Conclusiones

- Los cinturones urbanos son las zonas con mayor proporción de infecciones parasitarias intestinales en Guinea Ecuatorial (51,0% en Malabo y 34,2% en Bata), siendo el cinturón de Malabo el que presenta la mayor prevalencia. Esto contrasta con la baja prevalencia de las parasitosis intestinales en las zonas rurales (4,5% en Bioko y 16,5% en la Región Continental)
- Los parásitos intestinales que más afectan a la población guineo-ecuatoriana y que aparecen como un gran problema de salud pública a nivel nacional son: *Trichuris trichiura*, seguido de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, *Ascaris lumbricoides* y *Giardia duodenalis*, tanto en la Región Insular como en la Continental.
- En la Isla de Bioko emerge la infección por *Schistosoma intercalatum/guineensis*, nunca descrito como autóctono de esta región, en elevados niveles (11,0%) y en una población que nunca salió de la Isla. No obstante, la observación de las características morfológicas de los huevos no permite asegurar si la especie presente es *S. intercalatum*, *S. guineensis*, una mezcla de ambas o un híbrido entre ambas especies o con *S. haematobium*.
- Los participantes VIH negativos menores de 15 años de Bioko, de las zonas del cinturón urbano, presentaron un porcentaje mayor de poliparasitismo (34,0%) y de *Schistosoma intercalatum/guineensis* (70,0%) que la población adulta, pudiendo relacionarse este hecho con su colaboración en las actividades domésticas en contacto con el agua. Toda esta actividad se realiza principalmente en los ríos, lo que sugiere su posible contaminación.

- La probabilidad de parasitismo por *Trichuris*, Uncinarias, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* y *Cryptosporidium* spp. aumenta en un (59,9%, 56,0%, 71,3% y 79,7-91,9% respectivamente) para las personas que viven con el VIH/SIDA.
- En la Región Continental, el porcentaje de parásitos intestinales detectado en pacientes VIH-positivos (76,9%) ha resultado significativamente más baja que en los pacientes de la Isla de Bioko (81,5%). Dos factores pueden haber influido en este resultado: 1) que en la UREI y CTA de la Región Continental se ofrecen tratamientos completos con metronidazol y mebendazol y/o albendazol a los pacientes VIH-positivos que acuden a su control y seguimiento, como profilaxis y prevención de parasitosis intestinales y 2) que el hacinamiento y la falta de higiene medioambiental en esta Región es menor que en la Isla, donde confluyen inmigrantes nacionales y de países africanos de la Subregión en busca de las ofertas laborales que ofrece el auge de la explotación petrolera.
- Las altas proporciones detectadas en este estudio de parásitos intestinales en los participantes VIH positivos de la Isla de Bioko y de la Región Continental (76,9% y 81,5% respectivamente) y VIH negativos (74,0% y 86,7% respectivamente), sólo pueden explicarse por las influencias de factores ambientales, hídricas, alimenticias y de higiene personal deficientes.

## **6.2 Recomendaciones**

Los médicos que atienden a los pacientes infectados con VIH pueden reducir la morbilidad y la mortalidad causada por infecciones oportunistas a través de un diagnóstico temprano y del tratamiento oportuno de los parásitos intestinales. Por otra parte, las conclusiones de nuestro estudio ponen de relieve la gran necesidad de implementar:

- Políticas de educación sanitaria a la población.
- Estudios sobre el estado de contaminación de los ríos y los suministros de agua potable para determinar su participación en la transmisión de los parásitos intestinales.

- Medidas para volver con lo que antiguamente se ha hecho con los ríos, que es delimitar las zonas de los mismos en cuanto a uso humano.
- Políticas reforzadas de salud ambiental en los cinturones urbanos y zonas rurales.
- Estudios con técnicas de Biología Molecular que permitan el diagnóstico de especies patógenas y el conocimiento de la distribución de las especies y los genotipos de los parásitos que se encuentran en el país, sus posibles vías de transmisión y tratamiento según necesidad.

El control de helmintos y otros parásitos intestinales deben seguir siendo una prioridad por los expertos en salud pública, los ministerios de salud y los responsables de la política global.



**CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE**  
***Entamoeba histolytica, dispar y moshkovskii***



***RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DE Entamoeba histolytica, dispar y moshkovskii***

---



## **7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Entamoeba histolytica*, *dispar* y *moshkovskii* EN PACIENTES VIH POSITIVOS DE GUINEA ECUATORIAL**

### **7.1 Malabo –Isla de Bioko-**

#### **7.1.1 Descripción de los pacientes infectados por *E. histolytica/dispar/moshkovskii***

En el capítulo anterior, se describe que de las 260 muestras estudiadas procedentes de participantes VIH positivos de la Isla de Bioko, 112 (43,1%) resultaron positivas para *Entamoeba* spp. por alguno de los métodos de análisis utilizado, microscopía y/o ICR. De forma similar, de las 50 muestras de los pacientes VIH negativos, 21 (42,0%), resultaron positivas utilizando estos mismos métodos.

La media de edad de los pacientes con coinfección por VIH y *Entamoeba* spp. fue de  $36,05 \pm 10,61$  (rango 7-63 años), el 99,1% (111/112) adultos y sólo 1 niño (0,9%). Por otra parte, el 23,2% (26/112) eran varones y el 76,8% (86/112) mujeres, 13 (15,1%) de las cuales estaban embarazadas y todas ellas bajo tratamiento antirretroviral para prevenir la transmisión vertical. En lo que respecta al estado inmunológico, el 36,6% (41/112) eran inmunocompetentes, el 24,1% (27/112) tenían inmunosupresión moderada, el 22,3% (25/112) tenían inmunosupresión avanzada y el 15,2% (17/112) presentaban inmunosupresión severa, no disponiendo de valores para el restante 1,8% (2/112). En cuanto al lugar de residencia, el 2,7% (3/112) vivían en zonas rurales, el 30,4% (34/112) en la zona urbana y el 67,0% (75/112) en el cinturón urbano (Tabla RE-1).

Cuando se analizaron las muestras procedentes de los pacientes VIH negativos infectados por *Entamoeba* spp., la edad media fue de  $20,19 \pm 16,58$  (rango 3-52 años), con un 47,6% (10/21) de los participantes mayores de 15 años y un 52,4% (11/21) menores. De ellos, el 57,1% (12) eran varones y el 42,9% (9) mujeres y de ellas una estaba embarazada. En cuanto al lugar de residencia, un 4,8% (1/21) vivía en las zonas rurales, el 33,3% (7/21) en la zona urbana y el 61,9% (13/21) en el cinturón urbano (Tabla RE-1).

**Tabla RE-1.** Número de participantes infectados según los datos demográficos, estado inmunológico y lugar de residencia en la Isla de Bioko.

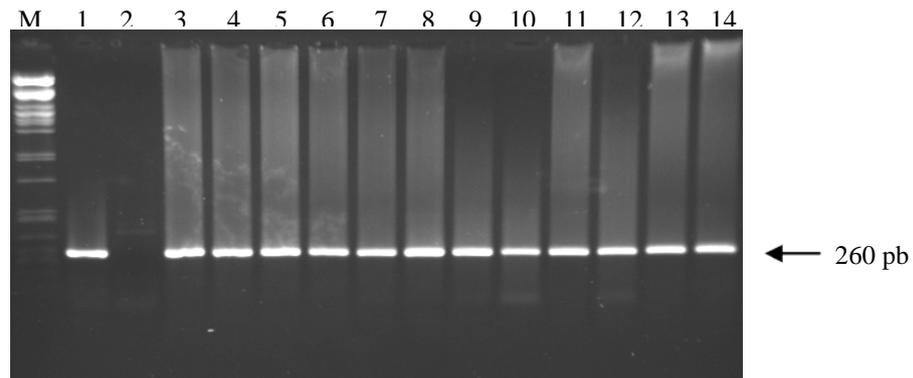
GRUPO	Nº	INC	ISM	ISA	ISS	S/V	Rural	Urbana	Cinturón
VIH+	112	41	27	25	17	2	3	34	75
VIH-	21	0	0	0	0	0	1	7	13
<b>TOTAL</b>	<b>133</b>	41	27	25	17	2	4	41	88

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

Además de estas muestras, otras 20 fueron seleccionadas al azar de entre aquellas que habían resultado negativas para *Entamoeba* spp. por las técnicas microscópicas y/o de inmunocromatografía, para valorar su posible amplificación por PCR. El 75,0% (15/20) de estas muestras provenían de participantes VIH positivos y el 25,0% (5/20) de VIH negativos. La edad media en este grupo fue de  $31,05 \pm 12,76$ , un 90,0% (18/20) eran adultos, 15 de ellos VIH positivos y el otro 10,0% (2/20) niños, todos ellos VIH negativos. Una de las muestras era de un varón y 19 de mujeres, 2 de las cuales estaban embarazadas y bajo tratamiento antirretroviral. Respecto al lugar de residencia, el 5,0% (1/20) vivía en zona rural, el 35,0% (7/20) en zona urbana y el 60,0% (12/20) en el cinturón urbano.

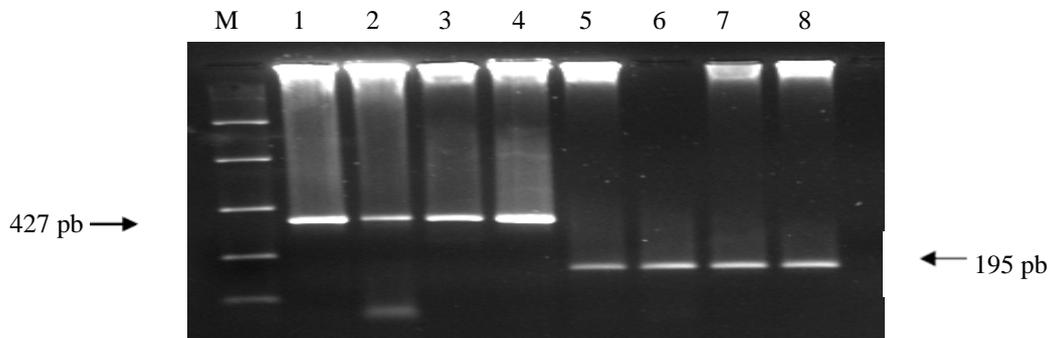
### 7.1.2 Identificación de especies de *Entamoeba* por PCR en muestras procedentes de participantes VIH positivos

Para la diferenciación de las especies del complejo *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, las muestras fueron sometidas a análisis por PCR con los primers y reacciones descritas en los apartados 3.4.2 de Material y Métodos. En la figura RE-1 y RE-2 se pueden observar los resultados obtenidos para algunas de las muestras.



M: marcador; 1: Control positivo; 2: control negativo; 3-14: Muestras con infección por *E. moshkovskii*.

**Figura RE-1:** Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los productos de la amplificación de la segunda PCR de *E. moshkovskii*

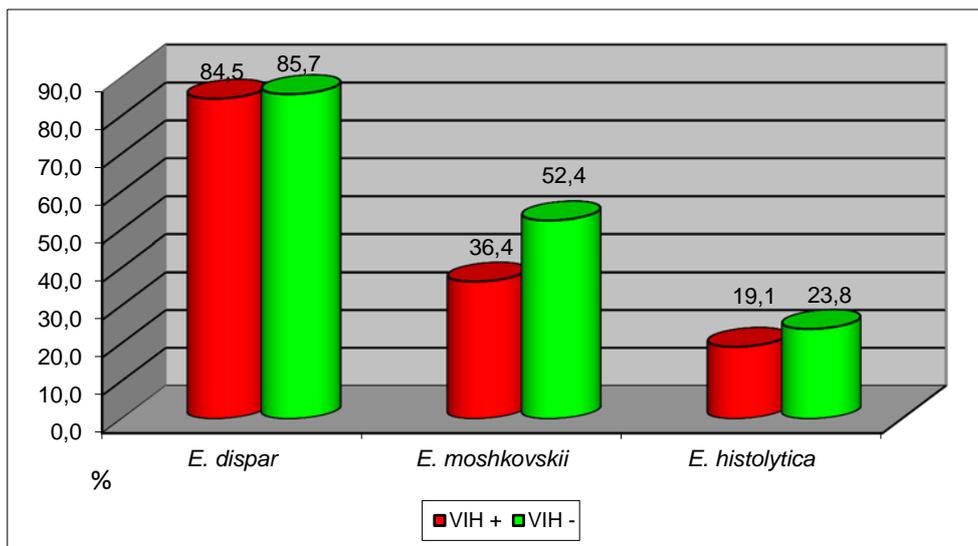


M: marcador; 1-4: Muestras positivas a *E. histolytica*; 5-8: Muestras positivas a *E. dispar*.

**Figura RE-2:** Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los productos de amplificación de la segunda PCR de *E. histolytica* y *E. dispar*.

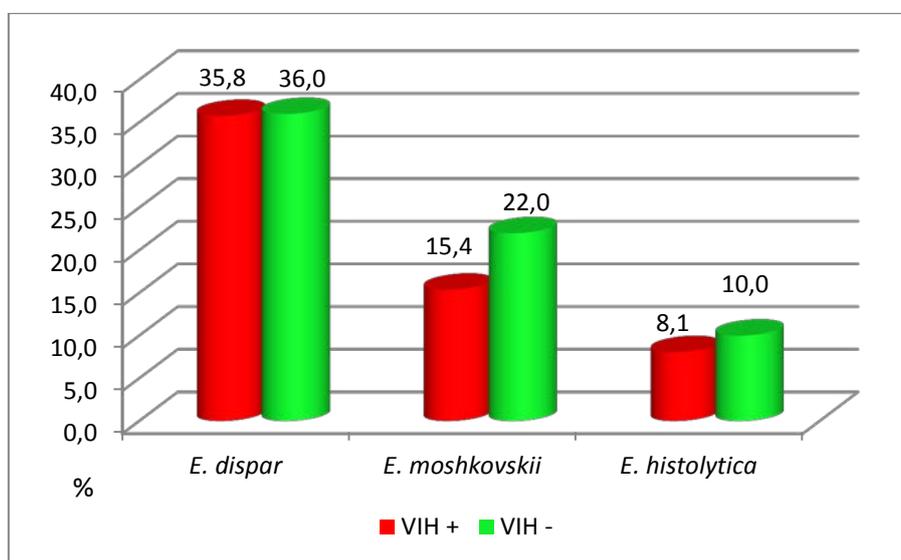
Se obtuvo amplificación positiva por PCR para alguna de las especies de *Entamoeba* analizadas en el 98,2% (110/112) de las muestras procedentes de participantes VIH positivos [IC95% (93,7-99,8)]. Las dos muestras en las que no se obtuvo amplificación habían sido diagnosticadas por visión directa, pero resultaron negativas por ICR.

En el total de las 110 muestras confirmadas por PCR, las especies se distribuyen de la siguiente manera: *E. dispar* se detectó en el 84,5% (93/110) de los participantes [(p<0,001)], *E. moshkovskii* en el 36,4% (40/110) y *E. histolytica* en el 19,1% (21/110), como se muestra en la figura RE-3.



**Figura RE-3.** Especies de *Entamoeba* identificadas en el estudio. Participantes VIH+/VIH-. I. Bioko.

Si se hace referencia a los 260 participantes VIH positivos de la Isla de Bioko, se puede decir que la prevalencia de las especies de *Entamoeba* es: *E. dispar*, en el 35,8% (93/260); *E. moshkovskii* en el 15,4% (40/260) y *E. histolytica* en el 8,1% (21/260), como se muestra en la figura RE-4.



**Figura RE-4.** Especies de *Entamoeba* identificadas en el total de participantes VIH+/VIH-. I. Bioko.

Como se puede observar en los resultados señalados más arriba, se han encontrado infecciones mixtas, con las combinaciones de especies que se muestran en la Tabla RE-2.

**Tabla RE-2.** Especies de *Entamoeba* identificadas en muestras de los participantes de la I. Bioko.

PARÁSITO	VIH+ (n=112)	% (IC95%)	VIH- (n=21)	% (IC95%)	TOTAL (n=133)
<i>E. histolytica</i>	7	6,2 (1,3-11,2)	1	4,8 (0,1-23,8)	6,0 (8/133)
<i>E. dispar</i>	54	48,2 (38,5-57,9)	8	38,0 (18,1-61,5)	46,6 (62/133)
<i>E. moshkovskii</i>	8	7,1 (1,9-12,3)	1	4,8 (0,1-23,8)	6,8 (9/133)
<i>E. dispar/moshkovskii</i>	27	24,1 (15,7-32,5)	7	33,3 (14,6-56,9)	25,6 (34/133)
<i>E. dispar/histolytica</i>	9	8,0 (2,5-13,5)	1	4,8 (0,1-23,8)	7,5 (10/133)
<i>E. histolytica/moshkovskii</i>	2	1,8 (0,2-6,3)	1	4,8 (0,1-23,8)	2,2 (3/133)
<i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i>	3	2,7 (0,5-7,6)	2	9,5 (1,1-30,3)	3,8 (5/133)

P=0,001 en la relación *E. dispar* mono-infección respecto al resto de especies.

En relación al lugar de residencia, la combinación de especies fue en la zona urbana del [38,2% (13/34)], en el cinturón urbano del [36,0% (27/75)], y en la zona rural del [33,3% (1/3)].

En cuanto a síntomas, el 51,8% (57/110) de las personas infectadas con alguna especie de *Entamoeba*, refirieron algún síntoma (diarrea, estreñimiento y otros).

Asimismo, se observó que de los 93 participantes infectados por *E. dispar*, un 72,0% (67/93) se encuentran bajo TARV frente al 28,0% (26/93) sin TARV. La infección por *E. dispar* no presentó asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables contempladas en el estudio.

La infección por *E. histolytica* se asoció a otros síntomas, que incluyen retortijones, aerofagia o dolor epigástrico, con una frecuencia de infección mayor en los participantes con sintomatología [28,9% (11/38) p=0,048 y OR=0,38 (0,14-1,0)], frente a un 13,5% (10/74) de personas infectadas entre las que no presentaban ningún síntoma. También en este caso, se observó asociación entre infección y el estar o no bajo TARV, con una proporción mayor en las personas que reciben TARV [23,5% (19/81), p=0,039, OR= 4,4 (1,0-20,4)], respecto a las que no lo reciben [6,5% (2/31)]. Otro factor que se aprecia es una tendencia a adquirir infección por *E. histolytica* en aquellos participantes pertenecientes a la categoría de nivel socioeconómico bajo (p=0,067), pero no se ha apreciado asociación entre infección por *E. histolytica* y otros parásitos intestinales.

*E. moshkovskii* se detectó sólo en pacientes con niveles de información higiénicas deficientes, con un 40,9% (36/88) de los participantes con nivel bajo parasitados y un 20,0% (4/20) en el nivel medio. No se encontró asociación entre infección por esta especie y género, edad, nivel socioeconómico, sintomatología o zona de residencia. Sí

se encontró asociación significativa entre la infección por *E. moshkovskii* y la infección por *Blastocystis hominis* ( $p=0,031$ ).

Para los participantes de este grupo, existe además asociación entre infección por *E. dispar* y por *E. histolytica* ( $p<0,001$ ).

No se ha encontrado asociación entre varones y mujeres y la parasitación por las especies de *Entamoeba*.

Atendiendo a los resultados obtenidos, tanto de aquellos que presentan asociación estadísticamente significativa como de aquellos que solo presentan una tendencia y como resumen de este apartado, se puede decir que:

El perfil del participante infectado por *E. histolytica* corresponde a una mujer (71,4%, 15/21), que vive en el área urbana (46,7%) o el cinturón urbano de Malabo (53,3%), tiene un nivel académico de educación primaria (60,0%) o secundaria (40,0%), un estatus socioeconómico medio (60,0%) o bajo (40,0%), una información higiénica baja (86,7%) y presentan otros síntomas intestinales (60,0%). Las personas inmunosuprimidas infectadas están bajo TARV.

El perfil del participante infectado por *E. dispar*, corresponde también a una mujer (77,4%; 72/93), que vive en el cinturón urbano de Malabo (69,4%), tiene un nivel académico de educación secundaria (43,1%) o primaria (50,0%), un estatus socioeconómico medio (73,6%), información higiénica baja (77,8%), siendo la mayoría inmunocompetentes. Esta infección no aparece asociada a ninguno de los síntomas considerados en el estudio.

En el caso de *E. moshkovskii*, el perfil del participante infectado corresponde también a una mujer (77,5%, 31/40), que vive en el cinturón urbano de Malabo (64,5%), tiene un nivel académico de educación primaria (54,8%) o media (35,5%), un estatus socioeconómico medio (71,0%), información higiénica baja (93,5%), e inmunocompetente y como en el caso anterior no aparece asociado ninguno de los síntomas considerados en el estudio.

### 7.1.3 Identificación de especies de *Entamoeba* por PCR en muestras procedentes de participantes VIH negativos

Para los participantes de este grupo, la amplificación de *Entamoeba* spp. por PCR fue del 100% (21/21). La especie más frecuente ha sido *E. dispar* ya que resultaron infectados por esta especie el 85,7% (18/21), seguida de *E. moshkovskii* que aparece en el 52,4% (11/21) y de *E. histolytica* con un 23,8% (5/21) de participantes infectados (Figura RE-3).

Si se considera el total de participantes VIH negativos, la prevalencia de especies queda como sigue: *E. dispar* 36,0% (18/50), *E. moshkovskii* 22,0% (11/50) y *E. histolytica* 10,0% (5/50) (Figura RE-4).

En este grupo, las combinaciones encontradas han sido: *E. dispar*/*E. moshkovskii* en un 33,3% (7/21), *E. dispar*/*E. histolytica*, así como *E. histolytica*/*E. moshkovskii* 4,8% (1/21) y de las tres especies *E. dispar*/*E. histolytica*/*E. moshkovskii* en un 9,5% (2/21), como se muestra en la Tabla RE-2. La combinación entre especies ha sido más frecuente en las zonas del cinturón urbano, 61,5% (8/13), y urbana, 42,9% (3/7), siendo nula en el área rural.

La única embarazada de este grupo presentó una infección mixta por *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

La infección por las diferentes especies no se ha asociado a ninguna de las variables de estudio. La infección por *E. histolytica* se asoció a la infección con Uncinarias ( $p=0,060$ ).

No se ha encontrado asociación entre varones o mujeres y la infección con las especies de *Entamoeba*.

### 7.1.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos

Cuando se analiza la infección por *Entamoeba* spp. en pacientes que conviven entre ellos, se observa que la probabilidad de infección por *E. moshkovskii* disminuye en un 40,2% para el grupo de personas VIH positivas, mientras que la probabilidad de

infección por *E. histolytica* y *E. dispar* aumenta en un 55,4% y 55,6% respectivamente. La tabla RE-3 muestra la OR entre el VIH y la coinfección de especies de *Entamoeba*.

No se encontró asociación entre las diferentes especies y la infección por el VIH.

La infección por *E. histolytica* se asoció con nivel socioeconómico bajo ( $p=0,011$ ) en pacientes VIH positivos.

**Tabla RE-3.** OR emparejado VIH+ y *Entamoeba* spp. Referencia VIH negativo. Isla de Bioko.

PARÁSITO	OR	IC95%	%
<i>E. dispar</i>	1,253	0,397-3,956	55,6
<i>E. moshkovskii</i>	0,671	0,243-1,853	40,2
<i>E. histolytica</i>	1,241	0,362-4,259	55,4

### **7.1.5 Identificación de especies de *Entamoeba* por PCR en muestras procedentes de participantes seleccionados al azar**

Al analizar las 20 muestras tomadas al azar se observó que un 55,0% (11/20) de ellas dieron amplificación positiva de *Entamoeba* spp. por PCR, identificando una (5,0%) muestra positiva para *E. histolytica*, 2 (10,0%) para *E. dispar* y 9 (45,0%) para *E. moshkovskii*. Se encontró una sola combinación entre *E. histolytica*/*E. dispar*.

En la figura RE-5 se detallan las zonas en que se han encontrado las diferentes especies de *Entamoeba*.

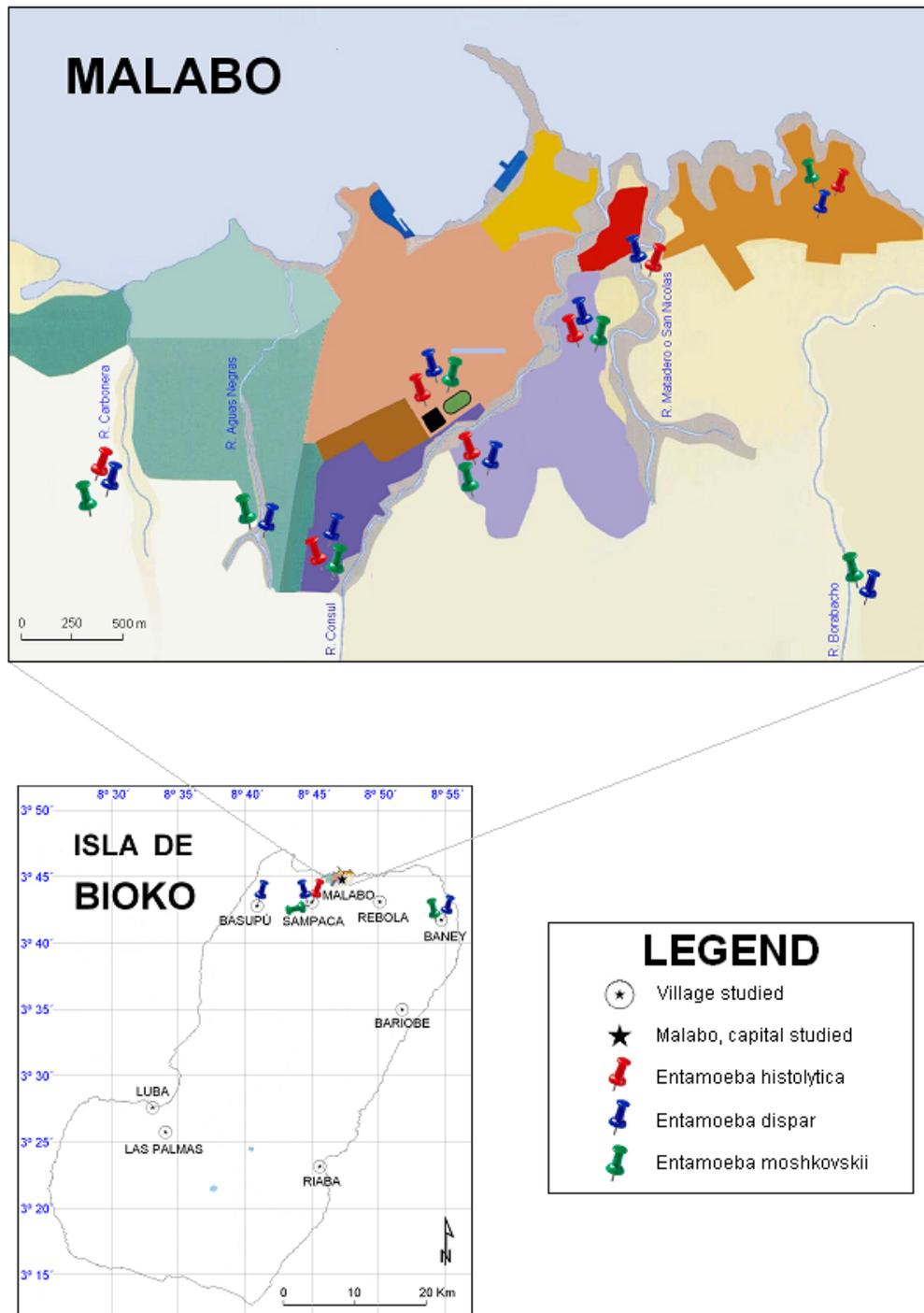


Figura RE-5. Mapa georeferenciado de las distintas especies de *Entamoeba*. Isla de Bioko.

## **7.2 Bata –Región Continental-**

### **7.2.1 Descripción de los pacientes infectados por *E. histolytica/dispar/moshkovskii***

En el capítulo anterior, se describe que de las 273 muestras procedentes de participantes VIH positivos de la Región Continental, 101 (37,0%) resultaron positivas para *Entamoeba* spp. por alguno de los métodos de análisis utilizados, microscopía y/o ICR. Así mismo, de las 60 muestras de los pacientes VIH negativos, 24 (40,0%) resultaron positivas.

La media de edad de los pacientes con coinfección por VIH y *Entamoeba* spp. fue de  $35,12 \pm 11,68$  (rango 1-58 años), siendo el 96,0% (97/101) adultos y el 4,0% (4/101) restante niños. El 19,8% (20/101) de participantes de este grupo eran varones y 80,2% (81/101) mujeres, de las cuales, el 8,6% (7/81) estaban embarazadas, dos con tratamiento antirretroviral para prevenir la transmisión vertical y cinco sin él. De todos los participantes de este grupo, el 36,6% (37/101) eran inmunocompetentes, el 16,8% (17/101) tenían inmunosupresión moderada, el 30,7% (31/101) inmunosupresión avanzada y el 15,8% (16/101) presentaban inmunosupresión severa. En cuanto al lugar de residencia, el 22,8% (23/101) vivían en zonas rurales, el 34,7% (35/101) en la zona urbana y el 42,6% (43/101) en el cinturón urbano (Tabla RE-4).

Cuando se analizaron las muestras procedentes de los pacientes VIH negativos infectados por *Entamoeba* spp., la edad media fue de  $28,50 \pm 16,36$  (rango 4-65 años), el 75,0% (18/24) de los participantes eran mayores de 15 años y el 25,0% (6/24) menores. Eran varones 9 (37,5%) y 15 (62,5%) mujeres, de éstas dos embarazadas. En cuanto al lugar de residencia, un 16,7% (4/24) vivían en las zonas rurales, el 45,8% (11/24) en las zonas urbanas y el 37,5% (9/24) en el cinturón urbano (Tabla RE-4).

**Tabla RE-4.** Datos demográficos, estado inmunológico y residencia. *Entamoeba* spp. R. Continental.

<b>Grupo</b>	<b>N°</b>	<b>INC</b>	<b>ISM</b>	<b>ISA</b>	<b>ISS</b>	<b>Rural</b>	<b>Urbana</b>	<b>Cinturón</b>
<b>VIH+</b>	101	37	17	31	16	23	35	43
<b>VIH-</b>	24	0	0	0	0	4	11	9
<b>TOTAL</b>	<b>125</b>	<b>37</b>	<b>17</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	<b>46</b>	<b>52</b>

INC: inmunocompetente, ISM: inmunosupresión moderada, ISA: inmunosupresión avanzada, ISS: inmunosupresión severa y S/V: sin valor

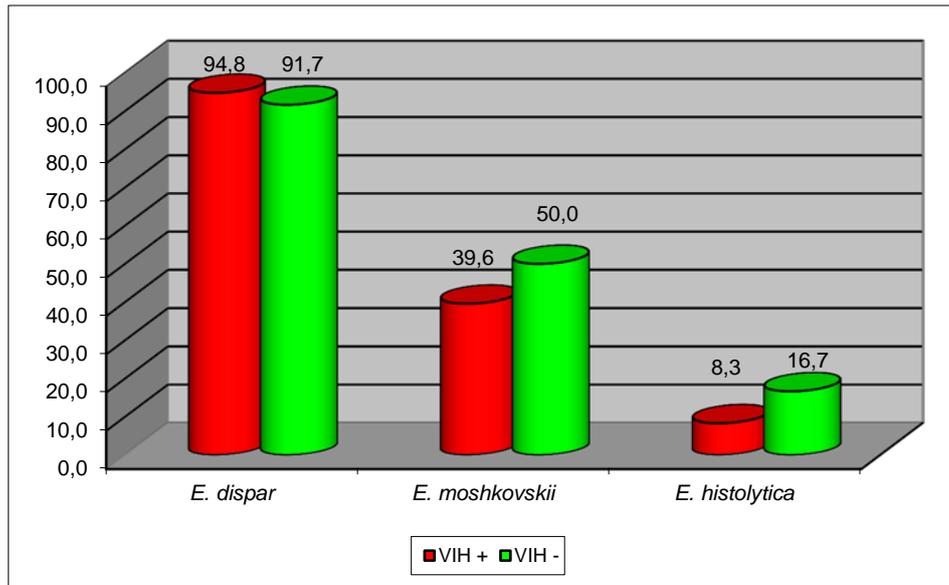
Además de estas muestras, otras 20 fueron seleccionadas al azar de entre aquellas que resultaron negativas para *Entamoeba* spp. por las técnicas microscópicas y/o de inmunocromatografía rápida, para valorar su posible amplificación por PCR. El 75,0% (15) de estas muestras correspondía a participantes VIH positivos y el 25,0% (5) a VIH negativos. La edad media en este grupo fue de  $33,2 \pm 15,6$ , con un 90,0% (18/20) de adultos, 15 de ellos VIH positivos y 10,0% (2/20) niños, todos ellos VIH negativos. 7 varones y 11 mujeres de ellas 2 embarazadas y sin TARV. Respecto al lugar de residencia, el 15,0% (3/20) vivía en zona rural, el 35,0% (7/20) en zona urbana y el 50,0% (10/20) en el cinturón urbano.

### **7.2.2 Identificación de especies de *Entamoeba* por PCR en muestras procedentes de participantes VIH positivos**

En los participantes VIH positivos en los que se había detectado *Entamoeba* spp. por microscopía y/o ICR, la amplificación positiva por PCR para alguna de las especies de *Entamoeba* fue del 95,0% (96/101), con un IC95% (88,8-98,4). Las muestras negativas por PCR habían sido positivas para *Entamoeba* por microscopía y negativas por ICR.

Las muestras positivas por PCR para *Entamoeba*, se distribuyen por especies de la siguiente manera: *E. dispar* es la que se detecta en mayor proporción [94,8% (91/96)], seguida por *E. moshkovskii* [39,6% (38/96)] y *E. histolytica* [8,3% (8/96)], como se muestra en la Figura RE-6 y la Tabla RE-5 junto con las combinaciones encontradas.

La combinación entre especies fue más frecuente en la zona rural ya que la presentan el 47,8% (11/23) de participantes parasitados por *Entamoeba* spp., seguida de la zona urbana, 37,1% (13/35) y el cinturón urbano, 34,9% (15/43).



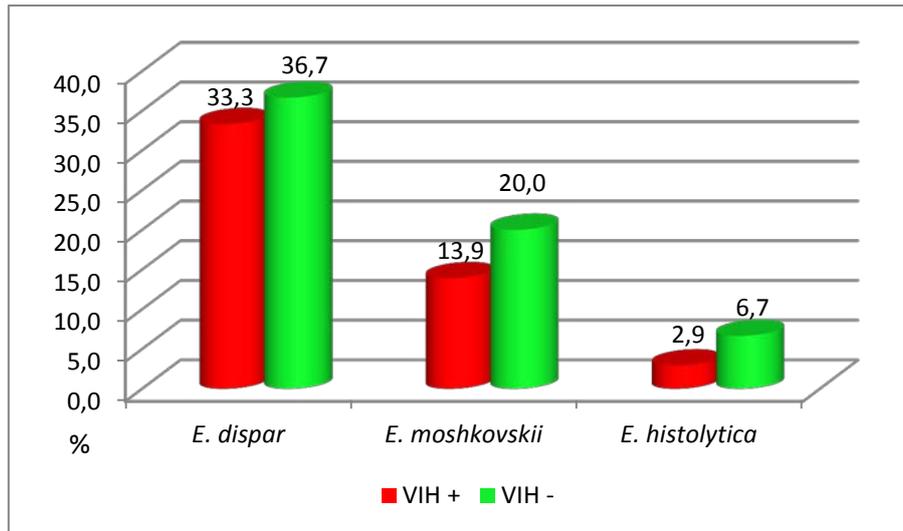
**Figura RE-6.** Especies de *Entamoeba* identificadas en el estudio. Participantes VIH+/VIH-. R. Continental.

**Tabla RE-5.** Proporción de especies de *Entamoeba* en el Continente en los pacientes VIH+/VIH-.

PARÁSITO	VIH+ (n=101)	%(IC95%)	VIH- (n=24)	%(IC95%)	TOTAL (n=125)
<i>E. histolytica</i>	1	1,0 (0,025-5,4)	2	8,3 (1,0-27,0)	2,4 (3/125)
<i>E. dispar</i>	52	51,5 (41,2-61,7)	8	33,3 (12,4-54,3)	48,0 (60/125)
<i>E. moshkovskii</i>	4	3,9 (1,9-9,8)	0	0	3,2 (4/125)
<i>E. dispar/moshkovskii</i>	32	31,7 (22,1-41,2)	12	50,0 (27,9-72,1)	35,2 (44/125)
<i>E. dispar/histolytica</i>	5	4,9 (1,6-11,2)	2	8,3 (1,0-27,0)	5,6 (7/125)
<i>E. histolytica/moshkovskii</i>	0	0	0	0	0
<i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i>	2	2,0 (0,24-7,0)	0	0	1,6 (2/125)

P<0,001 en la relación *E. dispar* mono-infección respecto al resto de especies.

Considerando los 273 participantes en el estudio, se puede decir que la prevalencia de las especies de *Entamoeba* en los pacientes VIH positivos en la Región Continental de Guinea Ecuatorial queda como sigue: *E. dispar* 33,3% (91/273), *E. moshkovskii* 13,9% (38/273) y *E. histolytica* 2,9% (8/273) (Figura RE-7).



**Figura RE-7.** Especies de *Entamoeba* identificadas en el total de participantes VIH+/VIH-. Continente.

Con respecto a los síntomas, el 71,9% (69/96) de las personas infectadas por *E. histolytica/dispar/moshkovskii* tenía diarrea, estreñimiento u otros síntomas. Considerando las especies por separado, ninguna de ellas presentó asociación importante con diarrea, estreñimiento u otros síntomas. La combinación de la infección de *E. histolytica* y *E. dispar* sí se asoció con diarrea ( $p=0,005$ ).

No hubo asociación significativa entre la infección por *E. dispar* con ninguna de las variables del estudio.

La infección por *E. histolytica* se detectó sólo en pacientes adultos y con niveles deficientes de información higiénicas, siendo más frecuente entre los participantes con el nivel bajo [87,5% (7/8)] y con el nivel medio [12,5% (1/8)]. Se encontró asociación significativa entre la infección por *E. histolytica* y *Chilomastix mesnili* ( $p=0,026$ ).

No se ha encontrado asociación entre infección por *E. dispar* o *E. moshkovskii* e infección por otros parásitos intestinales.

Según los resultados obtenidos, tanto de aquellos que presentan asociación estadísticamente significativa como de aquellos que solo presentan una tendencia, y como resumen de este apartado, se puede decir que:

El perfil del participante infectado por *E. histolytica* corresponde a una mujer (87,5%, 7/8), que vive en el cinturón urbano de Bata (42,9%), tiene un nivel académico de

educación primaria (100%), un estatus socioeconómico medio (42,9%) o bajo (57,1%), una información higiénica baja (85,7%), presentan otros síntomas intestinales (71,4%) y es inmunocompetente (57,1%) o presenta una inmunosupresión moderada (28,6%). Las personas inmunosuprimidas infectadas estaban bajo TARV.

El perfil del participante infectado por *E. dispar* corresponde también a una mujer (80,4%; 74/92), que vive en el cinturón urbano de Bata (44,6%) o en la zona urbana (36,5%), tiene un nivel académico de educación primaria (77,0%), un estatus socioeconómico medio (51,4%) o bajo (43,2%), información higiénica baja (66,2%), presenta otros síntomas intestinales (51,4%) y es inmunocompetente.

En el caso de *E. moshkovskii*, el perfil del participante infectado corresponde nuevamente a una mujer (84,2%, 32/38), que vive en el cinturón urbano de Bata (40,6%) o zona urbana (34,4%), tiene un nivel académico de educación primaria (84,4%), un estatus socioeconómico medio (40,6%) o bajo (50,0%), información higiénica baja (65,6%), con otros síntomas (53,1%) e inmunocompetente.

### **7.2.3 Identificación de especies por PCR en muestras procedentes de participantes VIH negativos**

El 100% (24/24) de las muestras positivas por microscopía o ICR dieron asimismo amplificación positiva para *Entamoeba* spp. por PCR, siendo la especie más frecuente *E. dispar* [91,7% (22/24)], seguida por *E. moshkovskii* [50,0% (12/24)] y *E. histolytica* [16,7% (4/24)] (Figura RE-6).

Considerando el total de 60 participantes VIH negativos seleccionados, la prevalencia de las especies queda como sigue: *E. dispar* 36,7% (22/60), *E. moshkovskii* 20,0% (12/60) y *E. histolytica* 6,7% (4/60) (Figura RE-7).

Las combinaciones encontradas se muestran en la Tabla RE-5. La combinación entre especies ha sido más frecuente en la zona rural [75,0% (3/4)], en el cinturón urbano [55,6% (5/9)] y en la zona urbana [54,5% (6/11)].

Las dos embarazadas de este grupo presentaron una infección mixta por *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

La infección por *E. moshkovskii* solo se encontró en participantes de nivel socioeconómico bajo [8,3% (1/12)] y medio [91,7% (11/12)]. La infección por esta especie se asoció a otros síntomas (dolor abdominal, retortijones, aerofagia...), 85,7% [(6/7),  $p=0,025$  y  $OR=11,0$  (1,0-114)].

#### 7.2.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos

Cuando se comparan los dos grupos de participantes que conviven entre ellos, se observa que la probabilidad de infección por *E. histolytica* y *E. moshkovskii* disminuye en un 31,3% y 35,0% respectivamente para el grupo de personas VIH positivas, mientras que la probabilidad de infección por *E. dispar* aumenta en un 53,6%. La tabla RE-6 muestra la OR para la coinfección por VIH y las diferentes especies de *Entamoeba*; sin embargo, no se encontró asociación entre las diferentes especies y la infección por VIH.

En cambio, la infección por *E. dispar* se asoció con el género, siendo más frecuente en la mujer, 91,1% (41/45) en el grupo de participantes VIH positivo ( $p=0,015$ ). La proporción de *E. dispar* fue más frecuente y significativa en los dos grupos ( $p=0,001$  en VIH negativos y  $p<0,001$  en VIH positivos).

**Tabla RE-6.** OR emparejado VIH+ y *Entamoeba* spp. Referencia VIH negativo. R. Continental.

PARÁSITO	OR	IC95%	%
<i>E. dispar</i>	1,157	0,350-3,830	53,6
<i>E. moshkovskii</i>	0,540	0,216-1,353	35,0
<i>E. histolytica</i>	0,455	0,105-1,966	31,3

#### 7.2.5 Identificación de especies por PCR en muestras procedentes de participantes seleccionados al azar

La proporción de la amplificación positiva de *Entamoeba* spp. por PCR fue del 55,0% (11/20). En este caso, las especies identificadas corresponden a *E. dispar* en un 40,0% (8/20), *E. moshkovskii* en un 5,0% (1/20) y *E. dispar*/*E. moshkovskii* en un 5,0% (1/20).

La proporción de la infección por *E. dispar* detectada fue mayor y estadísticamente significativa frente a las otras especies ( $p < 0,001$ ).

La localización de las especies de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* detectadas en la Región Continental se muestran en las Figuras RE-8.

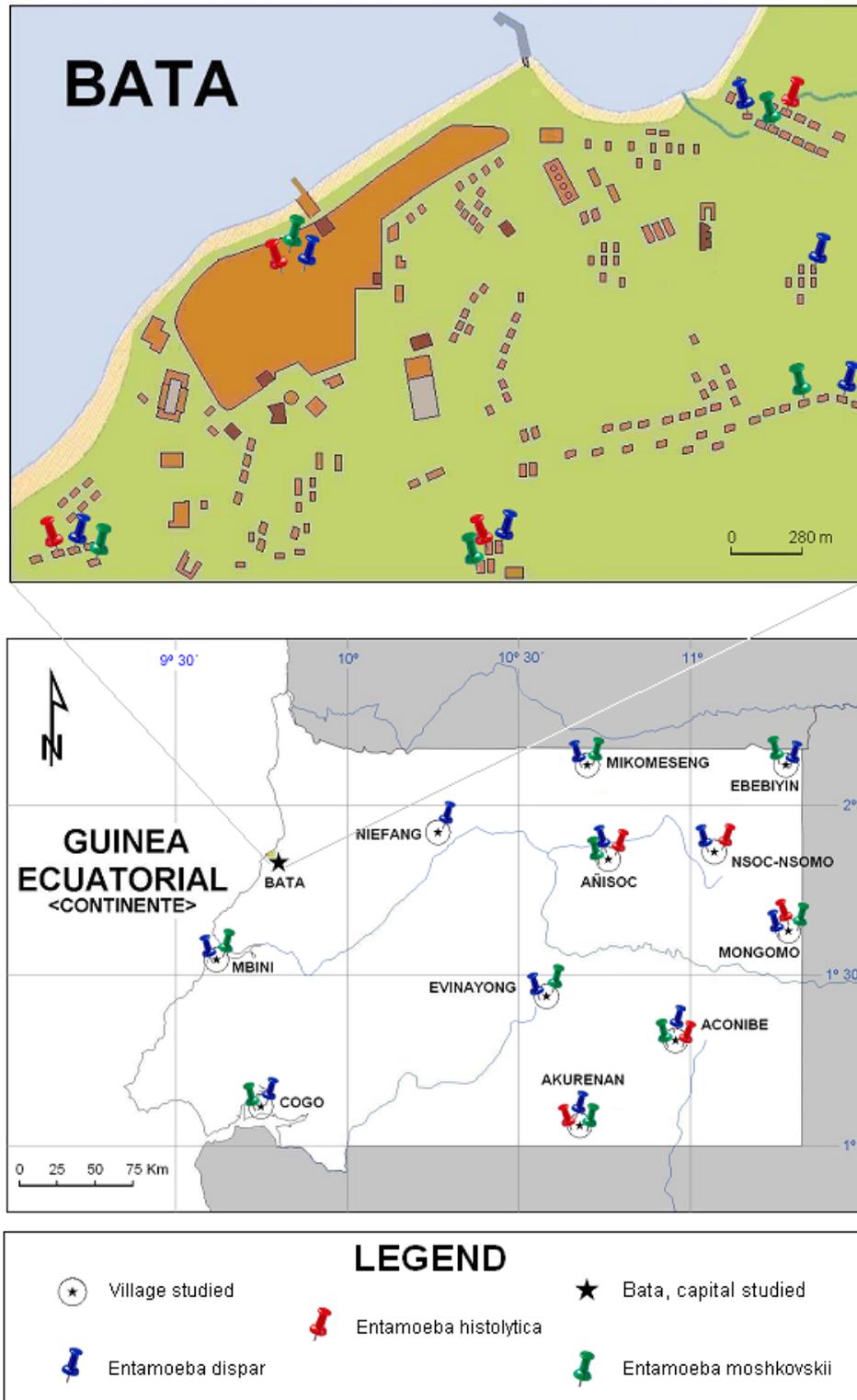


Figura RE-8. Mapa georeferenciado de las distintas especies de *Entamoeba*. R. Continente.

### **7.3 Comparación de los resultados encontrados en las dos regiones**

La proporción de amplificación positiva de *Entamoeba* spp. por PCR en Bioko en los dos grupos de participantes (98,2% en los VIH positivos y 100% en los VIH negativos) ha sido similar a la encontrada en el Continente (95,0% en los VIH positivos y 100% en los VIH negativos).

El porcentaje de infectados por *E. histolytica* fue mayor en la Isla que en el Continente en los dos grupos de participantes. En el grupo de VIH positivo hubo asociación entre las dos regiones, siendo mayor la infección en los participantes VIH positivo de Bioko [18,8% (21/112),  $p=0,021$ , OR= 2,7 (1,1-6,3)] respecto a los del Continente 7,9% (8/101)

### **7.4 Secuenciación de los productos de amplificación de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii***

Para comprobar las amplificaciones obtenidas, se procedió a la secuenciación de 2 de los fragmentos obtenidos para *E. histolytica* y 2 de los obtenidos para *E. dispar*.

En el caso de *E. moshkovskii*, considerando las escasas descripciones hechas de esta especie y las dificultades que la técnica entraña, cada una de las muestras fue sometida a PCR por duplicado y todos los amplicones obtenidos fueron secuenciados por ambos extremos. Las secuencias obtenidas mostraron una identidad que oscila entre el 95% y el 100% cuando se compararon entre sí y entre un 97,0% y 100% cuando se compararon con la secuencia elegida como referencia, con número de registro en el GenBank AF525285. Todas las secuencias diferentes resultantes del estudio fueron registradas en el GenBank.

## **7.5 Concordancia entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico de *Entamoeba* spp.**

El análisis de las técnicas utilizadas en este capítulo se ha realizado considerando todas las muestras en su conjunto ya que de esta forma se aumenta considerablemente el tamaño muestral.

Partimos pues de 643 muestras analizadas por Inmunocromatografía rápida con un test triple, que incluye la detección de *Entamoeba histolytica* específicamente, mediante visualización al microscopio y mediante PCR específica para cada una de las tres especies que se encuentran más habitualmente en el hombre: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

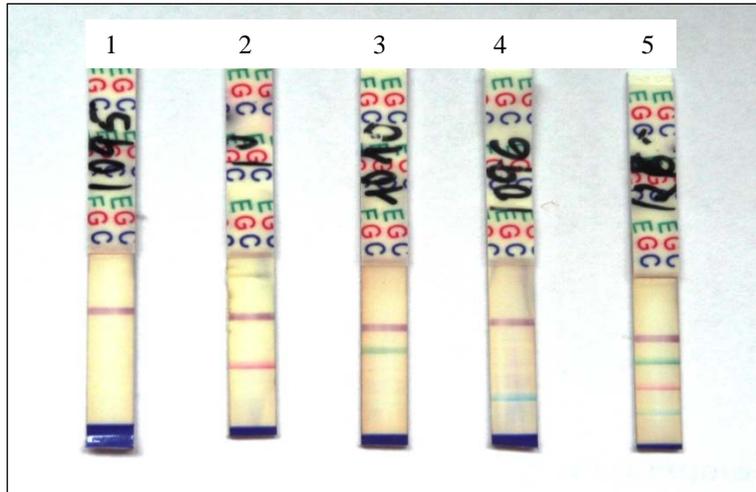
### **7.5.1 Las frecuencias positivas encontradas en cada caso fueron las siguientes:**

**Tabla RE-7.** Resultados de las distintas técnicas realizadas y su desviación típica.

Muestras	Microscopía	ICR	PCR <i>E. histolytica</i>	PCR <i>E. dispar</i>	PCR <i>E. moshkovskii</i>
Positivas	217 (33,7%)	41 (6,4%)	40 (6,2%)	235 (36,5%)	112 (17,4%)
D. típica	0,486	0,245	0,242	0,482	0,380

Si consideramos que los pacientes en los que se ha identificado *Entamoeba* spp. por microscopía son 217, se puede observar que solamente un 18,4% de ellos está infectado por la especie patógena *E. histolytica*.

Además, se ha evaluado la técnica de inmunocromatografía rápida para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* (figura RE-9) y la de microscopía para *Entamoeba* spp., tomando como referencia la técnica de PCR específica para las distintas especies.



1: Negativa; 2: *Giardia*; 3: *Entamoeba*; 4: *Cryptosporidium* y 5: *Giardia/Entamoeba/Cryptosporidium*

**Figura RE-9. Técnica de la inmunocromatografía rápida. Test triple.**

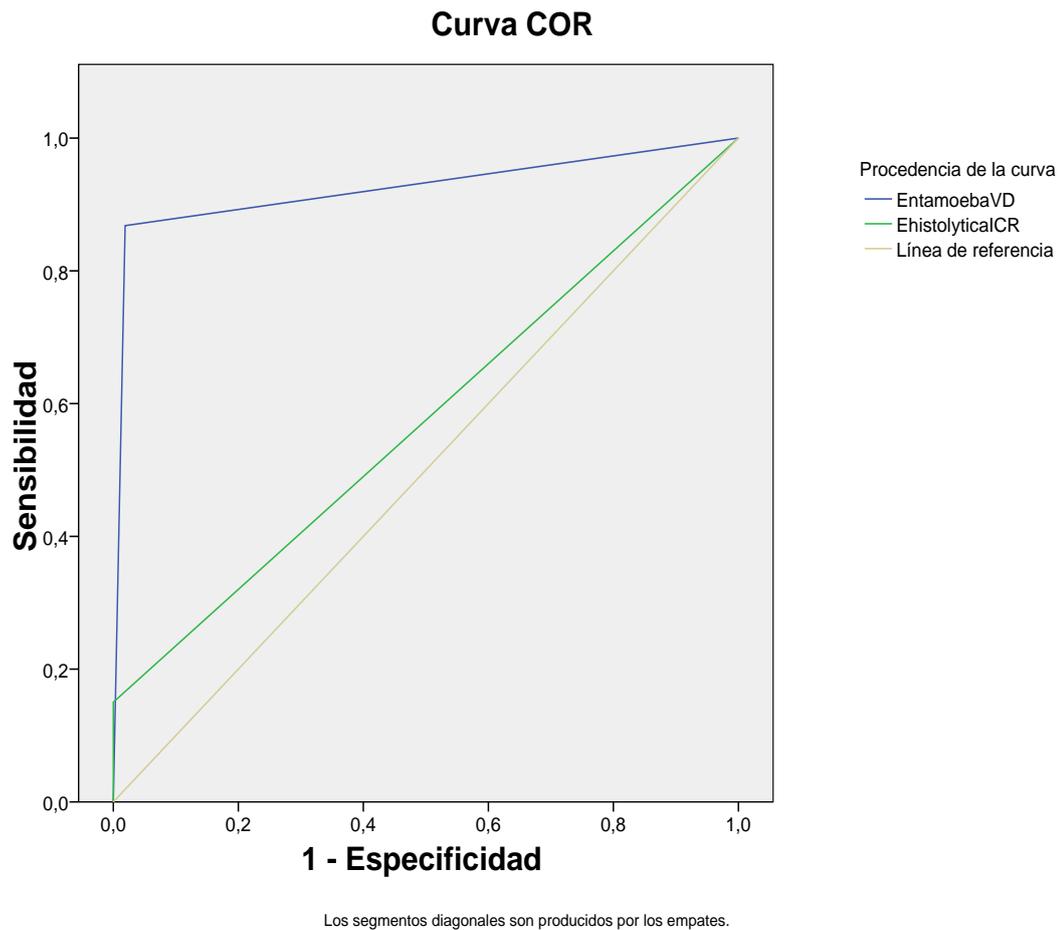
Para ello, se ha calculado la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), así como el nivel de concordancia e índice Kappa entre las técnicas. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla RE-8 y RE-9; así como en las figuras RE-10 y RE-11.

**Tabla RE-8.** Sensibilidad y especificidad de las técnicas. Técnica de referencia PCR.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Técnicas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	K
Microscopía	86,8%	98,1%	96,8%	91,8%	0,861
ICR	15,0%	100%	100%	63,8%	0,169

K: índice Kappa



**Figura RE-10.** Curva ROC de las técnicas de microscopía e ICR para PCR de *Entamoeba* spp.

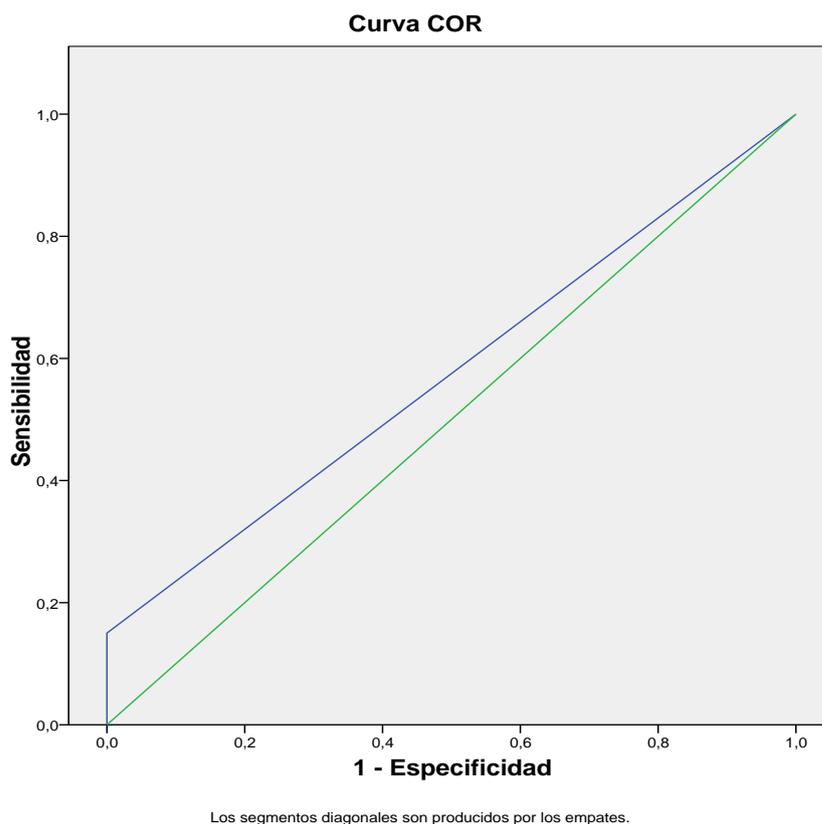
La técnica microscópica tiene mayor sensibilidad para detectar *Entamoeba* spp. y la técnica de ICR mayor especificidad. El área de diagnóstico correcto para microscopía es de 0,925 (0,900-0,950) y significativa ( $p=0,013$ ), mientras que la de ICR es de 0,575 (0,530-0,621) (Figura RE-10), aunque esta última técnica sea más específica, sobre todo, para la *Entamoeba histolytica*, para el diagnóstico global es significativamente mejor la visión directa.

**Tabla RE-9.** Sensibilidad y especificidad de la técnica de ICR. PCR para *E. histolytica*.

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	$\lambda$ (IC95%)	K
ICR	32,5	95,4	30,7	95,8	91,6 (89,4-93,7)	0,275

$\lambda$  : Nivel de concordancia; K: índice Kappa.



**Figura RE-11.** Curva ROC de las técnica de ICR para PCR de *E. histolytica*.

Si nos referimos sólo a *E. histolytica*, se aprecia un aumento de la sensibilidad para la técnica de ICR (Tabla RE-9) así como un aumento del área de diagnóstico correcto que alcanza el valor de 0,639 (0,537-0,742) (Figura RE-11).

Al analizar con detalle los datos obtenidos se observan algunas discrepancias. Catorce muestras presentan ICR positiva, pero no se observan quistes al microscopio. De ellas, 5 dan PCR positiva para *E. histolytica*, otras 5 son positivas para *E. dispar*, otra es positiva para *E. moshkovskii* y 3 para la combinación de *E. dispar* + *E. moshkovskii*.

En 217 muestras se observan quistes de *Entamoeba* spp. al microscopio, pero se obtiene inmunocromatografía rápida negativa. De ellas, 25 son positivas para PCR específica para *E. histolytica*, y un total de 190 resultaron positivas para *E. dispar*, *E. moshkovskii* o ambas por técnicas de PCR específicas.

Un total de 27 muestras han dado PCR positiva para *E. histolytica*, con ICR negativa. En dos de ellas, la visualización al microscopio también resultó negativa. Además, se obtuvieron 28 falsos positivos con ICR positiva y PCR específica para *E. histolytica*

negativa. Todas ellas resultaron positivas para *E. dispar*, *E. moshkovskii* o una combinación de ambas.



***DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
Entamoeba histolytica, dispar y moshkovskii***

---



## 8. DISCUSION DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Entamoeba histolytica*, *dispar* y *moshkovskii*

En el capítulo anterior se describía la alta proporción de *E. histolytica/dispar/moshkovskii* encontrada tanto en pacientes VIH positivos (43,1% en Bioko y 37,0% en la Región Continental) como en los VIH negativos (42,0% en Bioko y 40,0% en la Región Continental). Esta prevalencia es mucho más alta que la hallada en el único estudio realizado en el país (9,8%), sobre detección de protozoos en personas VIH positivas (Fuentes *et al.*, 2007). En otros estudios realizados en el mundo, las prevalencias de este parásito son variables. Así, en Nigeria se ha descrito una prevalencia del 9,2% en pacientes VIH positivos frente al 2,6% del grupo de participantes VIH negativos (Sanyaolu *et al.*, 2011). Otro estudio, realizado en otra región del mismo país, reporta una prevalencia del 21,0% y 15,6% respectivamente, también para participantes VIH positivos y VIH negativos (Babatunde *et al.*, 2010). En la India se ha descrito una frecuencia del 7,0% en pacientes VIH positivos (Kulkarni *et al.*, 2009); en México fue el 2,9%, en pacientes VIH positivos (Moran *et al.*, 2005), mientras que en Tanzania la prevalencia de *E. histolytica/dispar/moshkovskii* resultó del 20,0%, también en pacientes VIH positivos (Beck *et al.*, 2008). Se puede observar que la proporción de *E. histolytica/dispar/moshkovskii* en este trabajo, supera con creces las halladas en los demás estudios. Concretamente, comparando con el estudio de Fuentes *et al.* (2007), en Guinea Ecuatorial, las diferencias obtenidas son bastante llamativas. Pero también ha habido diferencias en cuanto a la metodología utilizada, ya que estos autores utilizan métodos de ELISA, mientras que en este estudio se han tomado como positivas aquellas que han resultado positivas por técnicas microscópicas o por ICR. No obstante, es necesario recordar que la técnica de microscopia no diferencia *E. histolytica* de *E. dispar* y de *E. moshkovskii*, cosa que sí hace la ICR y la técnica de ELISA utilizada por Fuentes *et al.* (2007). Además, atendiendo a estudios que valoran dichos métodos (Goñi *et al.*, 2012), para definir realmente la prevalencia y diferenciar las especies resultantes es necesario acudir a métodos de PCR.

También es preciso tener en cuenta que en el trabajo de rutina del Laboratorio Castroverde, la única técnica de diagnóstico disponible es la microscopía de heces con

lugol, por lo que cuando se detecta un caso positivo, el tratamiento se hace necesario. Partiendo de la hipótesis de que se va a encontrar coexistencia de al menos *E. dispar* y *E. histolytica*, se plantea la diferenciación de especies por técnicas moleculares. Las técnicas disponibles en el Laboratorio de Parasitología, de la Universidad de Zaragoza, han permitido concretamente la diferenciación de *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*.

En las dos regiones estudiadas, una pequeña proporción de las muestras han resultado positivas por visión directa, pero negativas por ICR y al llevar a cabo la PCR han resultado negativas. Se puede interpretar que alguna especie diferente a las que son capaces de identificar los primers utilizados se encuentre presente.

La proporción que suponen las diferentes especies en el total de las muestras positivas para *Entamoeba* en la Isla y en el Continente presenta pequeñas diferencias, ya que en el Continente, la abundancia relativa de *E. dispar* respecto a las otras especies es superior a la encontrada en la Isla, tanto en el grupo de participantes VIH positivos, como en el de VIH negativos. La otra diferencia se encuentra en la prevalencia de *E. histolytica*, siempre superior en los participantes VIH negativos respecto a los positivos, pero más de dos veces superior en el Continente que en la Isla. Este resultado está de acuerdo con lo encontrado por otros autores que reflejan en sus trabajos que *E. dispar* se encuentra más diseminada que las otras especies de *Entamoeba* (Ali *et al.*, 2003; Samie *et al.*, 2006; Nazemalhosseini *et al.*, 2010).

Al analizar la prevalencia de cada una de las especies obtenidas en las dos regiones geográficas y en los dos grupos de población estudiados, se observa que es muy similar para *E. dispar* y *E. moshkovskii*, pero desciende considerablemente para *E. histolytica* en los participantes VIH positivos de la Región Continental, respecto a la obtenida el mismo tipo de participantes en la Isla. Esto puede ser resultado de la profilaxis que estos pacientes reciben con antiprotozoarios, como metronidazol, o antihelmínticos como mebendazol y/o albendazol, en los controles rutinarios de seguimiento a las personas VIH de la UREI de Bata, ya que está demostrado que el tratamiento con albendazol en pacientes VIH positivos reduce la carga de la infección por protozoos (Zulu *et al.*, 2002).

Por otra parte, la prevalencia obtenida en este estudio para las diferentes especies varía respecto a las descritas en estudios realizados en otros países. Por ejemplo, en Tanzania, se ha descrito una proporción del 5,0% para *E. dispar* y del 13,0% para *E. moshkovskii*, utilizando la técnica de PCR para su diferenciación y del 4,0% para *E. histolytica* aplicando la técnica de ELISA (Beck *et al.*, 2008). En los hospitales del norte de Sudáfrica la prevalencia fue del 25,3% para *E. dispar* y del 18,8% para *E. histolytica* (Samie *et al.*, 2006). En Bangladesh, en un estudio realizado en niños, la prevalencia encontrada fue del 35,8% para *E. dispar*, del 21,1% para *E. moshkovskii* y del 15,6% para *E. histolytica* (Ali *et al.*, 2003). En la primera comunicación de hallazgo de *E. moshkovskii* en la India, se encontraron las siguientes proporciones: el 8,8% para *E. dispar*, el 2,2% para *E. moshkovskii* y el 1,7% para *E. histolytica* (Parija & Khairnar, 2005). Las diferentes especies también se han encontrado en combinaciones, destacando la alta proporción detectada de *E. dispar/moshkovskii*.

La infección por *E. dispar* fue significativamente mayor que la de otras especies en las dos regiones y grupos del estudio. En la Isla de Bioko, la proporción fue menor (84,5% en VIH positivo y 85,7% en VIH negativo) respecto al Continente (94,8% en VIH positivo y 91,7% en VIH negativo), quedando la prevalencia total de la población estudiada en el 35,8% en la Isla y el 33,3% en el Continente. Esta elevada proporción de la infección justifica el que no se haya encontrado asociación entre el parásito y la coinfección por el VIH. Tampoco se encontró asociación entre *E. dispar* y las diferentes variables del estudio. Cuando se compara con otros trabajos, y como se ha comentado ya anteriormente, se puede observar que en todos ellos, la infección por *E. dispar* es la predominante (Ali *et al.*, 2003; Samie *et al.*, 2006; Nazemalhosseini *et al.*, 2010).

La infección por *E. histolytica* fue mayor en la Isla que en el Continente, siendo la diferencia estadísticamente significativa en el grupo de VIH positivo entre las dos regiones. Además, esta prevalencia resultó más baja que la encontrada en otros países (Ali *et al.*, 2003; Samie *et al.*, 2006), pero se encuentran en línea con los encontrados por Fuentes *et al.* (2007) en Guinea Ecuatorial, Beck *et al.* (2008) en Tanzania y Nazemalhosseini *et al.* (2010) en Irán.

En los participantes VIH positivo de Bioko, se encontró una relación estadísticamente significativa entre la infección por *E. histolytica* y otros síntomas (retortijones,

aerofagia, dolor epigástrico...). También se encontró asociación estadísticamente significativa con las personas bajo tratamiento ARV.

En cambio, en el Continente, se encontró asociación entre la combinación de *E. histolytica* y *E. dispar* con diarrea en los participantes VIH positivos.

El estudio realizado en Sudáfrica mostró la asociación entre *E. histolytica*, diarrea y estado inmunológico (Samie *et al.*, 2006). Sin embargo, otras investigaciones realizadas con personas VIH positivas no demostraron asociación entre las especies de *Entamoeba* con síntomas gastrointestinales o diarrea, ni con estado inmunológico, ni serológico frente al VIH (Beck *et al.*, 2008, Nazemalhosseini *et al.*, 2010).

El hallazgo de *E. moshkovskii* en heces humanas es cada día mayor, así como su prevalencia como reflejan los datos publicados de Túnez con el 7,4% (Ayed *et al.*, 2008); de Irán con el 3,45% (Nazemalhosseini *et al.*, 2010) y de Australia con el 61,8% (Fotedar *et al.*, 2007).

La proporción de la infección por *E. moshkovskii* fue casi idéntica en las dos regiones y entre los grupos de participantes en nuestro estudio. La única asociación encontrada fue entre la infección y otros síntomas en el grupo VIH negativo del Continente, lo que puede llegar a poner en entredicho la teoría hasta ahora barajada de que *E. dispar* y *E. moshkovskii* no son parásitos invasivos (Ali *et al.*, 2003), o que tal vez *E. moshkovskii* pudiera ser patógena en humanos, como proponen Fotedar *et al.* (2007)

La prevalencia total de *E. moshkovskii* en los grupos de población estudiados, es del 16,5% en la Isla de Bioko y del 15,0% en el Continente, siendo también siempre más alta en los participantes VIH negativos que en los VIH positivos. Estos resultados están en línea con la prevalencia encontrada en Tanzania (13,0%), mucho más alta que la encontrada en Túnez (7,4%) o en Irán (3,45%), y mucho más baja que la encontrada en Bangladesh (21,1%) o en Australia (61,8%). Las diferencias en estos datos, podrían indicar que se trata de una ameba con una cierta especificidad geográfica. También es cierto que la alta prevalencia de la infección por *E. moshkovskii* en los lugares en que se ha detectado, sugiere que tal vez los seres humanos son verdaderos hospedadores para esta supuesta ameba de vida libre, y que no sea solo una infección transitoria en humanos (Ali *et al.*, 2003).

Además, se encontró asociación significativa entre la infección por *E. histolytica* y la infección por *E. dispar* en participantes VIH positivos de Bioko, así mismo, entre *E. histolytica* y *E. dispar* y entre *E. histolytica* y *E. moshkovskii* en los participantes VIH negativos del Continente.

Cuando se han comparado los resultados obtenidos para las personas VIH positivas y VIH negativas que residían en la misma casa, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la infección por *E. histolytica* con niveles socioeconómicos bajos. Las personas VIH positivas de esta región, tienen mayor riesgo de adquirir infecciones parasitarias por *E. histolytica* y *E. dispar*.

En cambio, en los participantes VIH positivos del Continente, la asociación entre la infección por *E. dispar* y el género fue significativa, siendo mayor en la mujer. En las personas VIH negativas de esta región, la asociación se dio entre *E. moshkovskii* y otros síntomas como se demostraba en Bioko en participantes seronegativos; este grupo tiene mayor riesgo de adquirir infecciones por *E. histolytica* y *E. moshkovskii*.

En este estudio no se ha encontrado relación entre coinfección por VIH y las distintas especies de *Entamoeba*, como tampoco lo encontraron Beck *et al.* (2008).

Los métodos moleculares son la mejor herramienta para el diagnóstico de las especies de *Entamoeba*.

La aparición de amplificaciones positivas para algunas especies en las muestras negativas por microscopia e ICR, se puede interpretar considerando que tienen un pequeño número de quistes de *Entamoeba* y/o se encuentran tan deteriorados que no son detectables por microscopia y no alcanzan el umbral de detección de la ICR. Como dato importante para la salud pública, en estas muestras se ha detectado una proporción muy pequeña de *E. histolytica*, lo que implica a su vez que son pocos los casos de infección por esta ameba patógena los que se pierden.

Por otra parte, en este estudio se describe por primera vez el hallazgo de *E. moshkovskii* en Guinea Ecuatorial, coexistiendo con *E. dispar* y *E. histolytica* en importantes proporciones. Aunque algunos autores han comunicado que esta ameba podría ser potencialmente patógena para el ser humano (Fotedar *et al.*, 2008; Pritt & Clark, 2008), los datos obtenidos muestran que no se puede relacionar la infección de *E. moshkovskii*

con síntomas intestinales, sugiriendo que se trata de una ameba no patógena. Tampoco *E. dispar* o *E. histolytica* aparecen asociadas a sintomatología, indicando que el continuo contacto con los parásitos puede llevar a que los pacientes no desarrollen esta sintomatología. No resulta extraño que la infección por *E. moshkovskii* aparezca en combinación con la de *E. dispar* o *E. histolytica*, ya que se identifica mayoritariamente en pacientes con alto riesgo de adquisición de amebiosis (condiciones sanitarias y socioeconómicas deficientes, personas que viven en hacinamiento, malnutrición, etc.), como han destacado otros autores (Stanley, 2003; Pritt & Clark, 2008)

Con objeto de intentar conocer las principales vías de transmisión entre las dos más probables, que incluyen la transmisión hídrica o el contacto persona-persona, junto con las costumbres higiénicas y el consumo de alimentos contaminados, se analizaron, en colaboración con Alicia García, otro miembro de nuestro grupo, mediante técnicas de PCR, muestras de agua de varias fuentes: del Río San Nicolás, del Río Borabecho, del Río Cónsul, de la red pública y de un depósito de agua que no era de consumo humano. Dichos análisis permitieron detectar DNA de *E. histolytica* en el depósito de agua, en el cual muchas personas se lavan las manos y *E. moshkovskii* en los Ríos San Nicolás y Borabecho. A partir de estos resultados se podría interpretar que *E. moshkovskii*, en línea con su origen como ameba de vida libre, se puede encontrar contaminando las aguas de algunos ríos de frecuente acceso por parte de la población. *E. histolytica* y *E. dispar*, podrían tener una vía de transmisión relacionada con el contacto interpersonal o con el consumo de alimentos contaminados. No obstante para confirmar esta hipótesis, será necesario realizar estudios más estructurados de aguas y tomando muestras en diferentes puntos de los ríos. Además, la técnica de PCR utilizada, permite detectar DNA de las diferentes especies de *Entamoeba*, pero el fragmento amplificado es muy conservado y no contiene por lo tanto los polimorfismos necesarios para poder realizar una genotipificación y determinar si existe identidad entre los aislamientos que se encuentran en el agua y los que se encuentran en los pacientes.

Respecto a las técnicas utilizadas, se obtuvo una sensibilidad muy baja de la técnica de ICR frente a microscopía y PCR. La especificidad sin embargo, es muy alta cuando se compara con ambos métodos. Los valores obtenidos para la concordancia estadística y el índice Kappa también reflejan que el test no se puede utilizar como técnica única para el diagnóstico de *E. histolytica*, sino que es preciso combinarlo con otros métodos. Los resultados son algo peores a los obtenidos en trabajos de evaluación en el laboratorio

(Haque *et al.*, 1995; Goñi *et al.*, 2012), lo que se puede atribuir a que en el trabajo de campo las condiciones de conservación de los reactivos han podido no ser óptimas en momentos puntuales, o bien a la interferencia de otros parásitos o de otras especies de *Entamoeba*, como parece ser el caso de *E. dispar*, o al continuo contacto de los participantes con el parásito que se pretende analizar. Sin embargo, lo que sí queda claro, después de la identificación de especies, es que, dada la baja prevalencia de *E. histolytica* respecto a la de *Entamoeba* spp. identificada por los medios disponibles en el país, sería preciso utilizar técnicas que pudieran llevar a cabo esta diferenciación, si fuera posible PCR, de esta forma se evitaría el tratamiento indiscriminado de los pacientes, los efectos secundarios de éste y los costes que repercuten en la sanidad.



***CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Entamoeba  
histolytica, dispar y moshkovskii***

---



## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Entamoeba histolytica*, *dispar* y *moshkovskii*

### 9.1 Conclusiones

- Esta investigación constituye el primer estudio que se lleva a cabo en Guinea Ecuatorial sobre la distribución de especies de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* e incluye la primera descripción de la *E. moshkovskii* tanto en el país como en la subregión del África Central.
- *E. dispar* fue la especie predominante en las dos regiones y grupos de la investigación. Este hecho podría justificar la falta de asociación entre el parásito y la coinfección por el VIH. Tampoco se encontró asociación entre *E. dispar* y las diferentes variables del estudio.
- *E. histolytica* fue la especie que resultó minoritaria, comparada con *E. dispar* y *E. moshkovskii*, y se identificó en mayor proporción en participantes de la Isla de Bioko (8,4%) que en la Región Continental (3,6%). En los participantes VIH positivos de la Isla, la parasitación por *E. histolytica* se asoció a síntomas intestinales, mientras que en este mismo grupo de participantes en el Continente la combinación de la infección entre *E. histolytica* y *E. dispar* se ha asociado a la diarrea.
- La alta prevalencia que muestra la infección por *E. moshkovskii* en los participantes de esta investigación (16,5% en la Isla e 15,0% en el continente) puede indicar, de acuerdo con otros estudios realizados en el mundo, que los seres humanos pueden ser verdaderos hospedadores para esta ameba inicialmente considerada como ameba de vida libre. En los participantes VIH negativos de la Región Continental la presencia de *E. moshkovskii* en las heces se asoció con síntomas intestinales.
- Los participantes VIH positivos de la Isla de Bioko presentan mayor probabilidad de adquirir la infección por *E. dispar* y *E. histolytica* (55,6% y 55,4%) que los

participantes VIH negativos, mientras que para los de la Región Continental la que presenta mayor probabilidad es *E. dispar* (53,6%).

- La evidencia de *E. moshkovskii* en humanos, sugiere la necesidad de cambiar la nomenclatura de *Entamoeba histolytica/dispar* por una más ampliada que contenga esta especie: *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, como lo recomiendan algunos autores.

## 9.2 Recomendaciones

- El diagnóstico y los estudios epidemiológicos de la infección por *Entamoeba* spp., deben incluir herramientas para la diferenciación de las tres especies. De esta forma se evitaría el tratamiento indiscriminado de los pacientes, los efectos secundarios de éste y los costes que repercuten en la sanidad.
- Es necesario continuar investigando para conocer la prevalencia de la infección por *E. moshkovskii* en las regiones de África y su posible patogenicidad, en especial en las PVVIH.

**CAPÍTULO 6: TÉCNICAS MOLECULARES DE**  
***Cryptosporidium* spp.**



***EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE Cryptosporidium spp.***

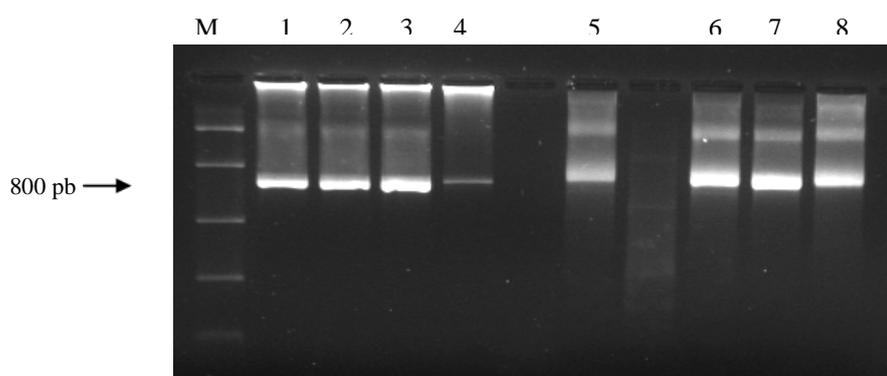
---



## 10. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EN GUINEA ECUATORIAL

Para llevar a cabo la identificación molecular de *Cryptosporidium*, se seleccionaron las muestras que habían resultado positivas por técnicas de visualización microscópica tras tinción ácido alcohol resistente Ziehl-Neelsen modificada (ZNM) e ICR descritas en el capítulo primero. De esta forma, 43 muestras fueron genotipadas por técnicas de Biología Molecular, 34 procedentes de participantes de la Isla de Bioko y 9 de la Región Continental. Además, como control de las técnicas utilizadas, se incluyeron 7 muestras seleccionadas al azar entre las que habían dado negativas por las técnicas antes mencionadas, 5 de ellas de participantes procedentes de la Isla y 2 del Continente. De las muestras positivas para ICR (34 en la Isla y 9 en la Región Continental), solamente 3, procedentes de la Isla, resultaron positivas por visualización al microscopio.

Dos fueron las técnicas de PCR aplicadas para la identificación de *Cryptosporidium*, la amplificación de un fragmento del gen *SSU-rRNA*, que permite identificar la especie, y la amplificación de un fragmento del gen de la *Glicoproteína GP60* de *Cryptosporidium* que permite su sub-genotipificación (Figura RC-1). Las secuencias obtenidas han sido registradas en el GenBank.



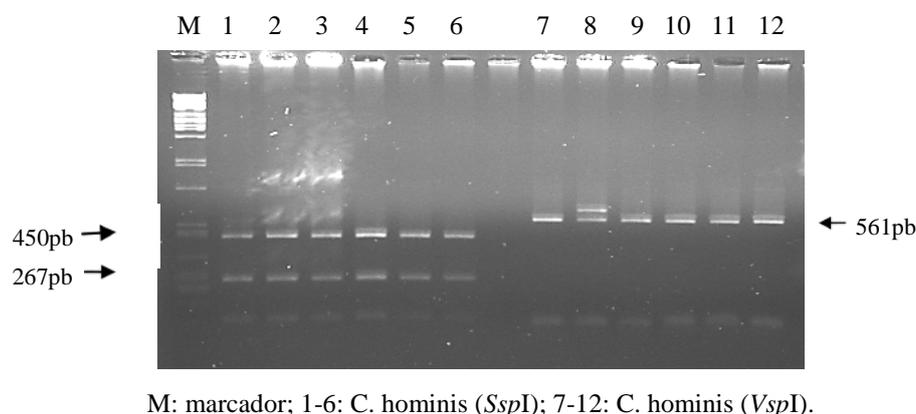
M: marcador; 1-4: muestras positivas al gen *SSU-rRNA*; 5-8: muestras positivas al gen *GP60*.

**Figura RC-1.** PCR del gen *SSU rRNA* y PCR del gen *GP60*

De esta forma, se consiguió la amplificación de 8 muestras para gen *SSU-rRNA* (4 de la Isla y 4 del Continente) y 10 para gen *gp60* (9 de la Isla y 1 del Continente). Todos los fragmentos obtenidos para este último gen, excepto uno, fueron secuenciados, y su secuencia analizada. La especie a la que correspondió cada uno de los aislamientos se

determinó por RFLP con *SspI* y *VspI* de los amplicones del gen *SSU-rRNA* (Figura RC-2).

En este último caso, para confirmar la especie, solo se sometieron a secuenciación las muestras cuando no se había producido amplificación del gen *gp60* o en el caso de especies no habituales en humanos. En total, se ha conseguido genotipar 14 aislamientos, lo que constituye un 32,6% de las muestras inicialmente consideradas como positivas.



**Figura RC-2.** RFLP con *SspI* y *VspI* de los amplicones del gen *SSU-rRNA*

## **10.1 Determinación de especies de *Cryptosporidium***

Las especies identificadas se muestran en la tabla RC-1, haciendo referencia a su procedencia.

**Tabla RC-1.** Distribución de especies de *Cryptosporidium* según su localización.

Procedencia	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i> + <i>C. parvum</i>	<i>C. suis</i>	TOTAL
Isla de Bioko	9 (90,0%)	1 (10,0%)	0	0	10
R. Continental	2 (50,0%)	0	1 (25,0%)	1 (25,0%)	4
<b>TOTAL</b>	<b>11 (78,6%)</b>	<b>1(7,1%)</b>	<b>1 (7,1%)</b>	<b>1 (7,1%)</b>	<b>14</b>

Si analizamos la distribución de las especies encontradas en función de su coexistencia con el VIH, los resultados que se obtienen se muestran en la Tabla RC-2.

**Tabla RC-2.** Distribución de especies de *Cryptosporidium* y coinfección VIH.

VIH	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i> + <i>C. parvum</i>	<i>C. suis</i>	TOTAL
VIH +	8 (72,7)	1(9,1)	1(9,1)	1 (9,1)	11
VIH -	3 (100%)	0	0	0	3
<b>TOTAL</b>	<b>11 (78,6%)</b>	<b>1(7,1%)</b>	<b>1 (7,1%)</b>	<b>1 (7,1%)</b>	<b>14</b>

Combinando ambos factores, fueron 11 los pacientes VIH positivos infectados, 7 de ellos procedentes de la Isla de Bioko (1 *C. parvum* y 6 con *C. hominis*), y los 4 restantes de la Región Continental (2 con *C. hominis*, 1 con infección mixta por *C. parvum*+ *C. hominis* y 1 con *C. suis*). Uno de estos pacientes correspondía a la única muestra procedente de los pacientes elegidos al azar que dio amplificación positiva. Los tres pacientes restantes eran VIH negativos, todos procedentes de la Isla de Bioko y todos ellos infectados por *C. hominis*.

En la Isla de Bioko, el único hallazgo de *C. parvum* en pacientes VIH positivos, corresponde a un adulto; mujer; bajo TARV de primera línea; con una inmunosupresión severa; con niveles de formación académica, información higiénica, así como nivel socioeconómico bajos, y que residía en el cinturón urbano. No presentaba sintomatología, ni convivía con animales. Así mismo, la infección por *C. hominis*, solo se presentó en adultos (4 mujeres y 2 varones), con un nivel de formación académica baja y media; todos ellos vivían en la zona urbana o cinturón urbano. La mitad de los participantes infectados presentaban diarrea. No se ha encontrado ninguna asociación entre la infección y las variables de estudio. Una de las muestras, identificadas por RFLP como *C. hominis*, detectada en esta región en un paciente VIH negativo, no se pudo secuenciar por la pequeña cantidad de DNA obtenido. Las dos restantes fueron detectadas en un adulto varón y en una niña. En ambos casos eran personas con un nivel de formación académica y de higiene bajos y todos ellos vivían en la zona urbana o cinturón urbano.

En la Isla de Bioko, cuando se comparan los pacientes VIH positivos y negativos que conviven con respecto a las especies de *Cryptosporidium* que se detectan, se observa que la probabilidad de infección por *C. hominis* aumenta en un 59,3% en el grupo de participantes VIH positivos; OR=1,455 (0,212-9,984).

Si el mismo análisis se realiza en la Región Continental, el único caso de *C. parvum* aparece en combinación con *C. hominis* en una mujer; con una inmunosupresión severa; con niveles de formación académica, información higiénica, así como nivel socioeconómico bajos, y que residía en el cinturón urbano de Bata. Presentaba diarrea y convivía con gatos. Para la especie *C. hominis*, la infección solo se dio en una persona, un varón con un nivel de formación académica bajo; con una inmunosupresión avanzada, presentaba diarrea y vivía en la zona rural.

El único caso de *C. suis*, descrito por primera vez en Guinea Ecuatorial correspondía a una mujer de la Región Continental, con niveles de formación académica y de higiene bajos, con una inmunosupresión moderada, que aunque viviera habitualmente en la zona urbana, frecuentaba y pasaba largas estancias en su pueblo donde era normal el contacto con ganado porcino y caprino.

En esta Región, una de las muestras seleccionadas al azar dio amplificación positiva, confirmándose la infección por *C. hominis*. La paciente era una mujer, con niveles de formación académica, socioeconómica, así como de información higiénica bajos, con una inmunosupresión moderada, vivía en el cinturón urbano y con contacto de animales (cerdos, cabras, perros, gatos y aves).

### **10.1.1 Asociaciones encontradas en las dos regiones**

La infección por *C. hominis* se asoció a la diarrea en los participantes VIH positivos, donde la proporción fue más frecuente en los que presentaban diarrea, el 62,5% (5/8), respecto a los que no 12,5% (3/24), con  $p=0,005$ ,  $OR= 11,6$  (1,8-76,0).

### **10.1.2 Secuenciación de los productos de amplificación de *Cryptosporidium***

El proceso de secuenciación fue realizado con éxito en 13 de los amplicones obtenidos (9 en Bioko y 4 en el Continente). Los 4 amplicones obtenidos como resultado de la amplificación del gen *SSU-rRNA* de la Región Continental fueron secuenciados para confirmar las especies, y el resto de las secuencias correspondieron al fragmento obtenido para el gen *gp60*.

### **Subgenotipificación molecular**

La utilización de la técnica de PCR que amplifica el fragmento de la glicoproteína GP60 permitió la sub-genotipificación de un total de 9 muestras: 7 *C. hominis* procedentes de la Isla de Bioko y una de la Región continental. La muestra restante que dio amplificación positiva, proporcionó una secuencia que no se pudo resolver por presentar dobles picos, sugiriendo una infección mixta por varios subgenotipos de *C. hominis*. También se pudo determinar el subgenotipo de una muestra de *C. parvum* procedente de la Región Insular.

Haciendo uso de la nomenclatura descrita por Sulaiman *et al.* en 2005, se han identificado los siguientes diferentes subtipos como lo refleja la tabla RC-3; tres de ellos han sido encontrados y descritos previamente y 5 no.

**Tabla RC-3.** Familia alélicas y subtipos de *Cryptosporidium* detectados en el estudio en relación a los subtipos de referencia publicados en el GenBank.

Especie	Familia alélica	Subtipo	N° de copias para <sup>a</sup>				N° de aislados	Hospedador	Origen	Referencia
			A (TCA)	G (TCG)	T (TCT)	R (ACA)				
<i>C. hominis</i>	Ib	IbA10G2R2	10	2	0	2	2	Humanos	R. Unido Malasia	Jex et al., 2008 Lim et al., 2011; Iqbal <i>et al.</i> , 2012
	Ib	IbA9G3R2	9	3	0	2	1	Humanos	Australia R. Unido G. Ecuatorial/B	Jex <i>et al.</i> , 2008; Pangasa <i>et al.</i> , 2010
	Ib	IbA9G2T1R2	9	2	1	2	1	Humanos	G. Ecuatorial/B	
	Ib	IbA4G1T1	4	1	1	0	1	Humanos	G. Ecuatorial/B	
	Ib	IbA8G4	8	4	0	0	1	Humanos	G. Ecuatorial/B	Chalmers <i>et al.</i> , 2007
	Ie	IeA11G3T3R1	11	3	3	1	1	Humanos	G. Ecuatorial/B	
	Ia	IaA18G3R1	18	3	0	1	1	Humanos	G. Ecuatorial/C	
<i>C. parvum</i>	IIa	IIaA8G3	8	3	0	0	1	Humanos	G. Ecuatorial/B	

a: N° de copias de copias de los codones codificantes para el aminoácido serina, localizados en el extremo 5' de la secuencia. B: Bioko; C: Continente.

***DISCUSIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE  
Cryptosporidium spp.***

---



## 11. DISCUSIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp.

La criptosporidiosis es causa frecuente de enfermedad diarreica en humanos y presenta distribución mundial. Históricamente, profundizar en la epidemiología de la infección humana ha resultado difícil, debido a la existencia de múltiples vías de transmisión (de persona a persona, de animal a persona, transmisión hídrica, alimenticia y transmisión por vía aérea), y a las dificultades para identificar las diferentes especies utilizando métodos convencionales, tales como la morfología de los ooquistes. En este sentido, la aparición de las técnicas moleculares ha promovido y tenido un impacto notable en el estudio de la epidemiología de la criptosporidiosis.

Las investigaciones realizadas utilizando técnicas moleculares, han demostrado que la gran mayoría de los casos humanos son causados por *C. hominis* y *C. parvum*. Curiosamente, se han constatado diferencias en la distribución geográfica y temporal, presentaciones de la enfermedad y los factores de riesgo para la infección tanto para *C. hominis* y *C. parvum*. Además, los análisis moleculares han puesto de manifiesto que otras especies, incluyendo *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* y *C. muris*, pueden infectar a los humanos y estar vinculadas a la enfermedad clínica, no sólo en inmunocomprometidos sino también en individuos inmunocompetentes (Cacciò, 2005).

De un total de 43 muestras detectadas por ICR, solamente el 7,0% (3/43) resultó positivo por tinción de ZNm, mientras que aplicando técnicas de PCR el 32,6% (14/43) fueron positivas. Esto sugiere que es posible la presencia de falsos positivos en el diagnóstico de *Cryptosporidium* por ICR y de falsos negativos con la tinción de ZNm. No obstante, hay que tener en cuenta que la técnica de microscopia con tinción ZNm no se puede tomar como “Gold Standard”, puesto que por la técnica de PCR se ha detectado un mayor número de positivos. Es posible que un bajo número de ooquistes en las heces haya dado lugar a que se produzcan falsos negativos por la técnica de microscopia. Por otro lado, se ha descrito que puede haber cambios en la morfología y tinción de ooquistes en muestras conservadas en formol (Clavel *et al.*, 1994), hecho que puede haber ocurrido en este caso, ya que las muestras han estado en medio SAF antes de realizar la tinción. También, menos de un 50,0% de las muestras positivas para ICR del estudio, confirmaron ser positivas por técnicas de PCR. Las técnicas de PCR no se

encuentran exentas de dificultades, ya que según nuestra experiencia la obtención de falsos negativos es posible. Por otra parte, estudios previos de valoración de este mismo test de ICR (Goñi *et al.*, 2012), demuestran como dato más significativo valores predictivos positivos (VPP) del 69,5% con microscopia como técnica de referencia y del 60,8% cuando la referencia es la PCR. Esto indica una alta probabilidad de encontrar falsos positivos, lo que estaría en línea con los resultados encontrados en este trabajo.

Además, está ampliamente demostrado que una de las causas que afectan a la sensibilidad de la ICR, y que lleva a la obtención de resultados discordantes entre las distintas técnicas diagnósticas, es la variabilidad antigénica existente dentro del género *Cryptosporidium* (Ungar, 1990; Llorente *et al.*, 2002), que a su vez, pueden afectar la viabilidad de los antígenos y su posterior reconocimiento por los anticuerpos monoclonales, como puede ser la inadecuada conservación de la muestra fecal durante el almacenamiento y/o transporte, así como la congelación y descongelación sucesivas de la misma (Ungar, 1990; el-Shewy *et al.*, 1994), lo que ha sucedido en nuestras muestras debido al transporte desde Guinea Ecuatorial.

Una de las muestras que no fue positiva por ICR, ni por visión directa de ZNm, dio positiva para PCR del gen *SSUrRNA*, demostrando la presencia con tan bajo número de ooquistes que no sean detectables por los métodos tradicionales.

Las bajas condiciones higiénicas y sanitarias que se registran, especialmente en los cinturones urbanos de Guinea Ecuatorial, así como la falta de tratamiento de las aguas de consumo, sugiere que los participantes que han presentado infección por *Cryptosporidium* spp. según la técnica de ICR, pueden haber sufrido exposiciones previas al parásito, provocando en ellos procesos crónicos o latentes donde la eliminación de ooquistes puede llegar a fluctuar o faltar, aunque continúen los antígenos presentes en las muestras fecales, como fue observada en zonas endémicas (Newman *et al.*, 1993).

Después de la secuenciación de los productos amplificados, se obtuvieron los siguientes resultados. El 78,6% (11/14) correspondía a infección por *C. hominis*; este valor es superior al encontrado en el único estudio realizado en el país que ofrecía el 44,1% (Blanco *et al.*, 2009). El 7,1% (1/14) corresponde a la infección por *C. parvum*; en esta especie los valores han sido más bajos que en el estudio de Blanco *et al.* (2009), donde

aportan valores del 52,9%. El 7,1% corresponde a la infección mixta entre *C. parvum* y *C. hominis*, y el 7,1% (1/14) a la infección por *C. suis*. Es la primera vez que, en Guinea Ecuatorial se describe una infección mixta por *C. parvum* y *C. hominis* y la primera descripción en humanos de *C. suis*.

La utilización de la técnica de PCR que amplifica el fragmento de la glicoproteína GP60 permitió la sub-genotipificación de 9 muestras (8 *C. hominis* procedentes de la Isla de Bioko y una de la Región continental y 1 *C. parvum* procedente de la Región Insular).

Haciendo uso de la nomenclatura descrita por Sulaiman *et al.* en 2005, se han identificado los siguientes diferentes subtipos, dos de ellos han sido encontrados y descritos previamente: IbA10G2R2 en el Reino Unido y Malasia (Jex *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012), descrito como el más frecuente, está ampliamente distribuido en las poblaciones humanas y asociado a brotes transmitidos por el agua o por alimentos contaminados (Jex & Gasser, 2010). El subtipo IbA9G3R2 en Australia y en el Reino Unido (Jex *et al.*, 2008; Pangasa *et al.*, 2010) y el subtipo IbA8G4 (Chalmers *et al.*, 2007). Hay 5 diferentes subtipos no encontrados ni registrados previamente.

En nuestro estudio la especie predominante ha sido *C. hominis*, como muestran algunos estudios realizados en África en pacientes infectados por el VIH y en pacientes inmunocompetentes en Tanzania (Haupt *et al.*, 2005) y en Kenia (Gatei *et al.*, 2006), indicando que la transmisión antroponótica juega un papel importante.

En este estudio se describe por primera vez *C. suis* en humanos en Guinea Ecuatorial, que se encuentra relacionado con el contacto con ganado porcino por parte del paciente. La criptosporidiosis humana causada por especies zoonóticas diferentes a *C. parvum*, como es el caso de *C. suis*, ha sido detectada tanto en personas VIH positivas (Cama *et al.*, 2007) como en VIH negativas (Leoni *et al.*, 2006); y se ha asociado al contacto con animales (Llorente *et al.*, 2005; Chalmers *et al.*, 2009; Cieloszyk *et al.*, 2012); aunque algunos autores indican que se han de considerar otras vías de transmisión y que para ello es necesaria la aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de las posibles fuentes de infección (animales, agua, alimentos y humanos) para determinar la dinámica de transmisión de estas especies a humanos (Cama *et al.*, 2006; Morse *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2008).

Todos los casos de *C. hominis*, así como el único caso de infección mixta entre *C. hominis* y *C. parvum* encontrados en participantes VIH positivos estaban asociados a diarrea; la asociación se dio entre la infección por *C. hominis* y diarrea en los participantes seropositivos, de acuerdo con lo que muestran otros estudios (Cama *et al.*, 2007).

Cuando se comparan las personas que conviven, encontramos que las personas VIH positivas tienen mayor riesgo de adquirir infección por *Cryptosporidium* spp. que las VIH negativas, especialmente en aquellas zonas donde las condiciones higiénicas, sanitarias y socioeconómicas son limitadas (Mor & Tzipori, 2008), como lo muestra nuestro estudio, donde el 84,6% (11/13) de los casos caracterizados correspondían a participantes VIH positivos y aumenta en ellos la posibilidad de infectarse por *C. hominis*.

***CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA  
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp.***

---



## 12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp.

### 12.1 Conclusiones

- Tres han sido las especies de *Cryptosporidium* identificadas en Guinea Ecuatorial: *C. hominis* como especie mayoritaria (78,6%), indicando la importancia de la transmisión antroponótica, *C. parvum* (7,1%), y *C. suis*, que se detecta en una participante VIH positivo de 39 años de edad, residente en la zona urbana de la Región Continental, que tenía contacto esporádico con ganado porcino, lo que indica la existencia de transmisión zoonótica.
- La mayoría de las personas con criptosporidiosis tenían niveles bajos de información higiénica, aunque no se haya encontrado asociación estadísticamente significativa.
- Los participantes VIH positivos presentaron una mayor probabilidad de adquirir parasitosis por *C. hominis*.
- La infección por *C. hominis* se asoció con diarrea en los participantes VIH positivos.
- Se han identificado por primera vez ocho subtipos de *Cryptosporidium* en Guinea Ecuatorial, tres de ellos (IbA10G2R2, IbA9G3R2 y IbA8G4,) han sido encontrados y descritos previamente en otros países y los otros cinco (IbA9G2T1R2, IbA4G1T1, IeA11G3T3R1, IaA18G3R1 y IIaA8G3) se describen por primera vez. Ninguno de los subtipos aparece como claramente predominante, lo que demuestra que existe una gran diversidad de subtipos diseminándose entre la población.

### 12.2 Recomendaciones

Serán de gran importancia las medidas que se lleven a cabo para prevenir estas parasitosis en la población, sobre todo, en las personas que viven con el VIH. Algunas sugerencias son:

- Llevar a cabo el tratamiento del agua de consumo filtrándola e hirviéndola después.

- En las UREIs y CTAs, intentar no retrasar el inicio del TARV en los que lo necesitan para restaurar los linfocitos CD4+, ya que permite la recuperación clínica o la erradicación de esta parasitosis.
- Llevar a cabo medidas de saneamiento ambiental, educación para la salud de la población y un sistema adecuado de tratamiento de las aguas a nivel nacional.

## **CAPÍTULO 7: GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia duodenalis***



***GENOTIPIFICACIÓN DE Giardia duodenalis POR  
TÉCNICAS MOLECULARES***

---



### 13. GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia duodenalis* POR TÉCNICAS MOLECULARES

Para llevar a cabo la identificación molecular de *Giardia duodenalis*, se seleccionaron las muestras que habían resultado positivas por técnicas de visualización microscópica e ICR en el capítulo 4. De esta forma 68 muestras, correspondientes a 68 pacientes, fueron seleccionadas para su estudio por técnicas de Biología Molecular, 44 procedían de la Isla de Bioko y 24 de la Región Continental. Además, como control de las técnicas utilizadas, se incluyeron 6 muestras seleccionadas al azar entre las que habían dado negativas con las técnicas antes mencionadas, 4 de ellas de participantes procedentes de la Isla y 2 del Continente. De las 68 muestras, 27 fueron positivas por microscopia y 19 por ICR, siendo positivas 22 muestras por ambas técnicas.

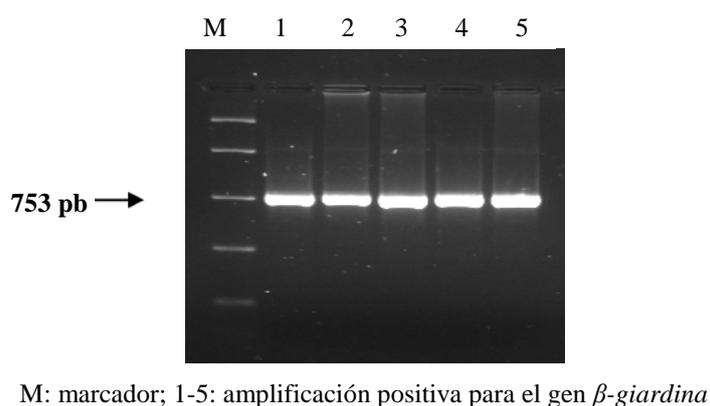
Tres fueron las técnicas de PCR aplicadas para la identificación de estas muestras, la amplificación de un fragmento del gen *tpi* que permite diferenciar el genotipo A y el genotipo B y que proporciona bandas de 550 y 140 pb respectivamente, que en adelante denominaremos fragmento corto, la amplificación de un fragmento de 530 pb del gen *tpi* (fragmento largo) y, finalmente, la amplificación del gen  $\beta$ -*giardina*. Las secuencias obtenidas de las dos últimas técnicas de amplificación de genes, han sido registradas en el GenBank.

En las muestras procedentes de la Isla de Bioko se consiguió la amplificación positiva por PCR del 90,9% (40/44) de las muestras positivas para *Giardia duodenalis*. De ellas, el 52,5% (21/40) lo fue para el fragmento corto del gen *tpi*, el 5,0% (2/40) para el fragmento largo de este gen, el 5,0% (2/40) para el gen de la  $\beta$ -*giardina*, el 17,5% (7/40) para los genes *tpi*/ $\beta$ -*giardina*, el 15,0% (6/40) para la combinación de los primers que amplifican el fragmento corto del gen *tpi*/fragmento largo del mismo, el 2,5% (1/40) para el gen  $\beta$ -*giardina*/fragmento largo del gen *tpi* y el 2,5% (1/40) para los tres genes amplificados  $\beta$ -*giardina*/*tpi* fragmentos corto y largo. De las dos muestras positivas por PCR, del grupo elegido al azar, fueron positivas para el fragmento del gen *tpi* (Tabla RG-1 y Figura RG-1).

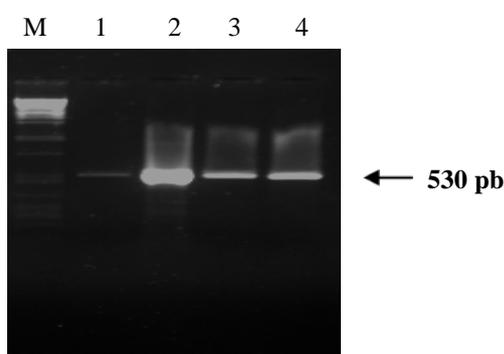
**Tabla RG-1.** Distribución de la amplificación positiva de los genes según su localización.

Procedencia	<i>tpi</i> (corto)	<i>tpi</i> (530 pb)	$\beta$ - <i>giardina</i>	<i>tpi</i> / $\beta$ - <i>giardina</i>	<i>tpi</i> corto/ largo	<i>Tpi</i> largo/ $\beta$ - <i>giardina</i>	<i>tpi</i> corto/largo/ $\beta$ - <i>giardina</i>	TOTAL
Isla de Bioko	23	2	2	7	6	1	1	42
R. Continental	13	0	2	6	0	0	1	22
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>64</b>

En la Región Continental se consiguió la amplificación positiva por PCR del 87,5% (21/24) de las muestras positivas para *Giardia duodenalis*. De ellas, el 61,9% (13/21) fue para el fragmento del gen *tpi*, el 4,8% (1/21) para el gen de la  $\beta$ -*giardina*, el 28,6% (6/21) para los genes *tpi*/ $\beta$ -*giardina* y el 4,8% (1/21) para los tres genes amplificados  $\beta$ -*giardina*/*tpi* fragmento corto/largo. La muestras positivas por PCR, del grupo elegido al azar, fue positiva para el fragmento del gen de la  $\beta$ -*giardina*. (Figura RG-1).



**Figura RG-1.** Segunda PCR del gen  $\beta$ -*giardina*



M: marcador; 1-4: amplificación positiva para el fragmento largo del gen *tpi*

Figura RG-2. Segunda PCR del fragmento 530 pb

### 13.1 Identificación de genotipos de *Giardia duodenalis*

Los genotipos identificados se muestran en la tabla RG-2, haciendo referencia a su procedencia.

**Tabla RG-2.** Distribución de genotipos de *Giardia* según su localización.

Procedencia	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A + Genotipo B	TOTAL
Isla de Bioko	1 (2,4%)	40 (95,2%)	1 (2,4%)	42
R. Continental	1 (4,5%)	20 (90,9%)	1 (4,5%)	22
<b>TOTAL</b>	<b>2 (3,1%)</b>	<b>60 (93,8%)</b>	<b>2 (3,1%)</b>	<b>64</b>

Si analizamos la distribución de las especies encontradas en función de su coexistencia con el VIH, los resultados encontrados se muestran en la Tabla RG-3.

**Tabla RG-3.** Distribución de genotipos de *Giardia* y coinfección con VIH.

VIH	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo A + Genotipo B	TOTAL
VIH +	1 (2,3%)	41 (95,3%)	1 (2,3%)	43
VIH -	1 (4,8%)	19 (90,5%)	1 (4,8%)	21
<b>TOTAL</b>	<b>2 (3,1%)</b>	<b>60 (93,8%)</b>	<b>2 (3,1%)</b>	<b>64</b>

Combinando ambos factores, fueron 43 los pacientes VIH positivos infectados, 29 de ellos procedentes de la Isla de Bioko (28 *Giardia duodenalis* genotipo B y 1 con la combinación del genotipo B y A) y 14 de la Región Continental (13 *Giardia duodenalis* genotipo B y 1 del genotipo A). Dos muestras procedían del grupo seleccionado al azar y dieron amplificación positiva de PCR para *Giardia* del genotipo B.

Del grupo de participantes VIH negativos, 21 estaban infectados por *Giardia*, 13 de la Isla de Bioko (12 *Giardia duodenalis* genotipo B y 1 del genotipo A) y 8 del Continente (7 *Giardia duodenalis* genotipo B y 1 con la combinación de los genotipos B y A). Una

de las muestras, con una infección por el genotipo B, procedía del grupo seleccionado al azar en la Isla de Bioko.

## **13.2 Determinación de asociaciones entre los genotipo de *Giardia duodenalis* y las variables del estudio**

En la Isla de Bioko, de todas las muestras procesadas por ICR y/o visión directa, el 90,9% (40/44) dieron amplificación positiva por PCR. El 95,0% (38/40) al genotipo B, el 2,5% (1/40) al genotipo A y el 2,5% (1/40) fue una combinación de los genotipos A y B, como muestra la tabla RG-2.

Los genotipos de *Giardia duodenalis* identificados se han relacionado con el nivel de información higiénica ( $p=0,032$ ), encontrándose un porcentaje mayor de infección en los participantes con niveles bajos de información higiénica [30 (75,0%)], frente a los de un nivel medio [7 (17,5%)] y alto [3 (7,5%)].

En el Continente, de todas las muestras procesadas por ICR y/o visión directa, el 87,5% (21/24) dieron amplificación positiva por PCR. Los genotipos encontrados fueron el 90,5% (19/21) genotipo B; el 4,8% (1/21) genotipo A y el 4,8% (1/21) correspondieron a la combinación de los genotipos A y B, como muestra la tabla RG-2.

### **13.2.1 Resultados de los participantes VIH positivos**

Considerando los participantes VIH positivos de Bioko, la amplificación positiva por PCR de *Giardia duodenalis* fue del 87,5% (28/32), con un IC95% (71,0-96,5). La distribución de genotipos identificados ha sido: el 96,4% (27/28) de la parasitosis por *Giardia duodenalis* fue debida a parásitos del genotipo B, además de un caso correspondiente a la infección por la combinación de genotipos A y B, que se ha dado en una mujer adulta, bajo TARV, que presentaba una inmunosupresión severa y que vivía en el cinturón urbano de Malabo.

La infección por genotipo B, se asoció con el nivel de información higiénica ( $p=0,047$ ); siendo más frecuente en los participantes con un nivel bajo de información higiénica [21 (75,0%)], frente al del nivel medio [5 (17,9%)] y el alto [2 (7,1%)].

En los participantes VIH positivos del Continente, se obtuvo amplificación positiva de alguno de los genes de *Giardia duodenalis* en el 92,9% (13/14), con un IC95% (66,1-99,8). Los genotipos identificados se distribuyen de la siguiente manera: el 92,3% (12/13) de la parasitosis por *Giardia duodenalis* genotipo B y solo un caso por *Giardia* genotipo A, identificado en un varón adulto, bajo TARV, que presentaba una inmunosupresión severa, con síntomas intestinales inespecíficos y que vivía en la zona rural de la Región Continental.

### 13.2.2 Resultados de los participantes VIH negativos

En los participantes VIH negativos de Bioko, la amplificación positiva por PCR de *Giardia duodenalis* fue del 100% (12/12) de las muestras previamente diagnosticadas por microscopia o ICR. En cuanto a los genotipos encontrados, el 91,7% (11/12) de los casos perteneció al genotipo B y solo uno al genotipo A, que se dio en un participante de 15 años, que presentaba diarrea, con un nivel de información higiénica baja y vivía en el cinturón urbano de Malabo. No se encontró ninguna asociación entre los genotipos encontrados y las variables del estudio en este grupo.

En los participantes VIH negativos del Continente, la amplificación positiva por PCR de *Giardia duodenalis* fue del 80,0% (8/10) de los casos previamente diagnosticados por microscopia o ICR. En cuanto a genotipos identificados, el 87,5% (7/8) pertenecían al genotipo B y un caso a la combinación del genotipo A y B que se ha dado en un varón, adulto, con niveles bajos de información higiénica y formación académica primaria que vivía en la zona urbana de Bata. Se ha encontrado una asociación entre la infección de *Giardia duodenalis* genotipo B y género ( $p=0,05$ ), siendo más frecuente la infección en los varones [75,0% (6/8)] respecto a las mujeres [25,0% (2/8)].

### 13.2.3 Resultado de las muestras recogidas al azar

De las cuatro muestras seleccionadas al azar, que no presentaban *Giardia duodenalis* ni por ICR, ni por visión directa en Bioko, el 50,0% (2/4) dieron amplificación positiva por alguna de las técnicas llevadas a cabo de PCR. De las dos muestras positivas para el genotipo B, una pertenecía a una mujer embarazada, que presentaba otros síntomas intestinales, VIH positiva, bajo TARV, con una inmunosupresión avanzada y con un

nivel bajo de información higiénica; la otra pertenecía a un niño de 9 años. Ambas procedían del cinturón urbano de Malabo.

De las dos muestras seleccionadas al azar que no presentaban *Giardia duodenalis* ni por ICR ni por visión directa del Continente, el 50,0% (1/2) dieron amplificación positiva por alguna de las técnicas llevadas a cabo de PCR. La infección positiva fue para el genotipo B y se dio en una mujer adulta, que presentaba diarrea y otros síntomas intestinales, VIH positiva, inmunocompetente, con un nivel de información higiénica baja y vivía en el cinturón urbano de la ciudad de Bata.

### **13.2.4 Comparación entre los participantes VIH positivos y VIH negativos**

Cuando se comparan los pacientes VIH positivos y negativos que conviven entre ellos, con respecto a los genotipos de *Giardia duodenalis*, la probabilidad de infección por *Giardia duodenalis* genotipo B aumenta en un 47,6%, OR=0,909 (0,07-11,19) y del genotipo A en un 34,4%, OR=0,524 (0,03-9,2) en el grupo de participantes VIH negativos. En la Isla de Bioko se encontró asociación entre genotipo B y el nivel de formación académica primaria y/o nula (p= 0,049).

En el Continente la probabilidad de infección por *Giardia duodenalis* genotipo B aumenta en un 68,0%, OR=2,12 (1,28-3,52) en los participantes VIH-positivos y del genotipo A disminuye en un 33,3%, OR=0,50 (0,32-0,794).

No se encontró asociación entre los diferentes genotipos de *Giardia* y la infección por el VIH.

### **13.3 Concordancia entre las técnicas de ICR con o sin Visión directa**

El análisis de las técnicas utilizadas en este capítulo se ha realizado considerando todas las muestras en su conjunto, ya que de esta forma se aumenta considerablemente el tamaño muestral.

Partimos pues de 643 muestras, analizadas por inmunocromatografía rápida, visualización microscópica y PCR específica para los genotipos A y B.

Las frecuencias obtenidas para las diferentes técnicas se muestran en la tabla RG-4

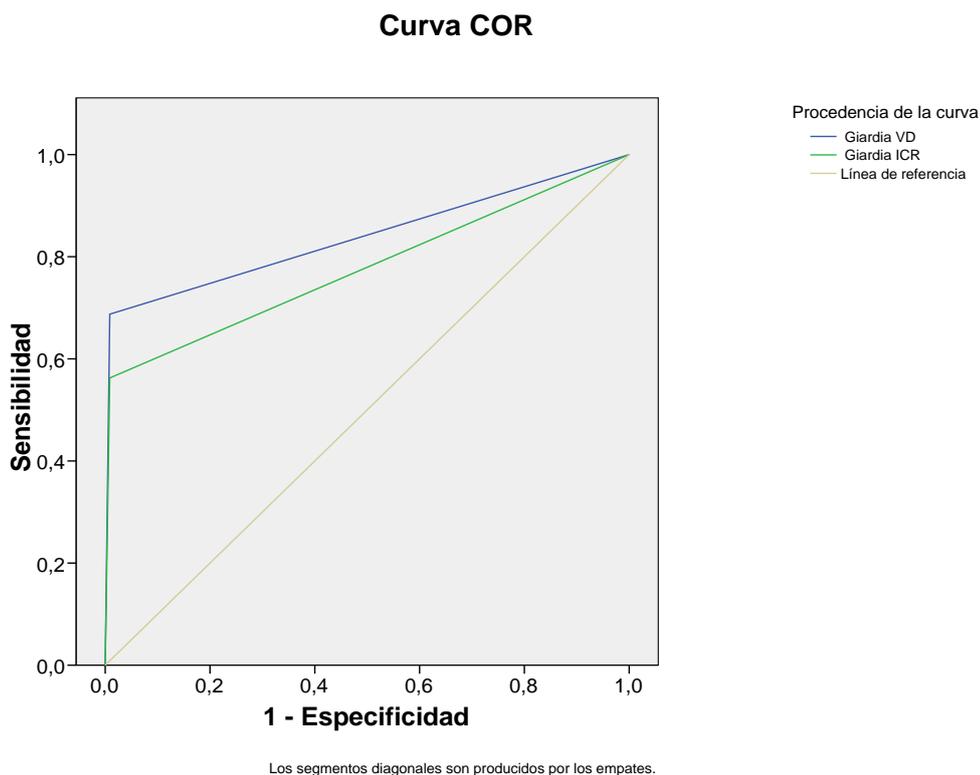
**Tabla RG-4.** Resultados de las distintas técnicas realizadas y su desviación típica.

Muestras	Microscopía	ICR	Gen <i>tpi</i>	Gen <i>tpi largo</i>	gen $\beta$ - <i>giardina</i>
<b>Positivas</b>	49 (7,6%)	41 (6,4%)	57 (8,9%)	11(1,7%)	20 (3,1%)
<b>D. típica</b>	0,266	0,245	0,284	0,130	0,174

En 49 pacientes se identificó *Giardia duodenalis* por microscopía. De ellos el 6,1% (3/49) presentaban el genotipo A y el 87,8% (43/49) el genotipo B.

De los 41 participantes positivos por la técnica de inmunocromatografía rápida para el diagnóstico de *Giardia* el 9,8 (4/41) estaba infectado por el genotipo A y el 82,9% (34/41) por el genotipo B.

El área bajo la curva ROC de diagnóstico correcto para microscopía es de 0,839 (0,777-0,909) y significativa ( $p=0,035$ ), mientras que la de ICR es de 0,777 (0,700-0,854) y significativa ( $p=0,039$ ). Como se puede observar los IC de ambas áreas coinciden en parte por lo que puede afirmarse que la diferencia entre ambas no es estadísticamente significativa (Figura RG-3).



**Figura RG-3.** Curva ROC de las técnicas de microscopía e ICR para PCR de *Giardia* spp.

El coeficiente de Kappa para la concordancia entre las técnicas de visión directa e ICR fue de 0,451, mientras que para visión directa y PCR fue de 0,758 y entre ICR y PCR de 0,659.

### **13.4 Secuenciación de los productos de amplificación de *Giardia* spp.**

De los 3 amplicones obtenidos para el gen *tpi* pertenecientes al genotipo A (secuencia corta), solamente uno dio una secuencia sin dobles picos, de 550 pb, que mostró un 99% de homología con las secuencias del mismo genotipo, como la registrada bajo el número de acceso EF688021.2, comparada con la cual presenta 4 SNPs (sustituciones nucleotídicas puntuales). La proteína resultante presenta una identidad máxima del 97% con la proteína registrada como ABW37946.2. Las diferencias se traducen en los siguientes cambios de aminoácidos: Prolina a Alanina en las posiciones 166 y 224;

Isoleucina a Metionina en la posición 226 y de Metionina a Lisina en la 241, posiciones siempre referidas a la secuencia de referencia antes mencionada.

Las otras dos secuencias presentaron dobles picos cuando se analiza este fragmento. Cuando se lleva a cabo la técnica descrita por Sulaiman que amplifica un fragmento de 530 pb, se obtiene amplificación positiva para 2 muestras que contienen *Giardia* genotipo A, una de ellas descrita por la técnica anterior como genotipo mixto A + B. Ambas muestras presentan una homología del 100% con la secuencia de referencia antes mencionada.

La PCR para  $\beta$ -*giardina* solamente ha dado amplificación positiva para una muestra genotipo A y presentó un 100% de homología con otras secuencias registradas en el GenBank, entre las que se encuentra la registrada con número HM165227.1.

En las muestras genotipo B, se consiguió la secuenciación del fragmento corto para 20 muestras, con presencia de dobles picos en el cromatograma de 14 de ellas. Para la técnica que amplifica un fragmento de 530 pb del gen *tpi*, se obtuvieron solamente dos amplificaciones, que presentan un 99% de homología con la secuencia de referencia registrada en el GenBank con número JF918523.1.

Para el gen de la  $\beta$ -*giardina* se han obtenido 4 amplificaciones positivas de *Giardia* correspondientes al genotipo B, que han dado homologías comprendidas entre el 99-100% con las secuencias de referencia registradas en el GenBank números JF918495.1, DQ090522.1 y JQ303244.1.



***DISCUSIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE Giardia  
duodenalis POR TÉCNICAS MOLECULARES***

---



## 14. DISCUSIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia duodenalis* POR TÉCNICAS MOLECULARES

Este es el primer estudio llevado a cabo en Guinea Ecuatorial sobre la prevalencia y la distribución de los diferentes genotipos de *Giardia duodenalis*.

*Giardia duodenalis* es un protozoo flagelado, patógeno entérico, que afecta a una amplia gama de hospedadores mamíferos, incluyendo seres humanos (Thompson RC *et al.*, 2000). También es el protozoo intestinal más frecuente en los seres humanos en todo el mundo (Thompson RC, 2004). La giardiosis es común en los países en desarrollo, llegando a constituir una enfermedad endémica donde las infecciones están asociadas a la pobreza, a las condiciones sanitarias deficientes, a la calidad del agua y al hacinamiento, pero también se encuentran con gran frecuencia en países desarrollados (Smith *et al.*, 2006).

En Asia, África y América Latina hay unos 200 millones de personas con giardiosis sintomática (WHO, 1996).

Dos publicaciones anteriores, en que se estudia la prevalencia de las parasitosis intestinales en Guinea Ecuatorial, realizados por Roche & Benito en 1999, y Fuentes *et al.* en 2007, encuentran prevalencias de *Giardia* similares a las encontradas en nuestra investigación. Roche & Benito describen un 7,2% en la zona rural y 8,6% en Malabo (Bioko), y Fuentes *et al.*, hablan de un 9,8% considerando pacientes pertenecientes tanto al territorio insular como al continental. En nuestro trabajo, la prevalencia en Bioko resulta algo más alta (14,2%), mientras que en la Región Continental es similar a las ciudades (9,8%), lo que se podría explicar por las mayores aglomeraciones de personas en la Isla, así como su condición de ecosistema cerrado.

Al aplicar técnicas moleculares, observamos que de las 68 muestras positivas por ICR y/o por visión directa para *Giardia duodenalis* (44 en Bioko y 24 en el Continente) el 89,7% (61/68) dieron amplificación positiva en alguna de las diferentes técnicas utilizadas de PCR. La dificultad que estas técnicas conllevan ha hecho recomendable la utilización de varias de ellas, lo que además permite caracterizar genéticamente mucho mejor los parásitos estudiados.

Además, los aislamientos de *Giardia duodenalis* presentan una amplia diversidad genética, aunque las cepas que afectan a los seres humanos se pueden agrupar en dos principales genotipos (asemblajes), que han sido nombrados como genotipos A y B (Thompson RC *et al.*, 2000). No obstante, en los últimos años, se ha descrito el hallazgo en seres humanos de otros genotipos como el E, el C o el D, cuyos hospedadores habituales son ganado, perros y gatos (Soliman *et al.*, 2001; Foronda *et al.*, 2008).

El genotipo A, se puede subclasificar en dos subgenotipos: cluster AI que se transmite tanto entre hombres como en animales, mientras que el subgenotipo AII se transmite preferentemente entre hospedadores humanos (Monis *et al.*, 1996; Thompson, 2000; Thompson *et al.*, 2000;).

El genotipo B de *Giardia*, ha sido encontrado tanto en el hombre como en animales, aunque el ser humano es el principal reservorio de la infección y los animales constituyen un reservorio menor (Thompson *et al.*, 2000; Amar *et al.*, 2002).

Cuando se analiza la distribución de los genotipos de *Giardia* encontrados en la Isla de Bioko, se observa que en las muestras de los participantes VIH positivos el 96,4% pertenecen al genotipo B y el 3,6% a genotipos mixtos. La persona con la infección mixta presentaba una inmunosupresión severa; en este grupo se ha encontrado asociación entre el genotipo B ( $p=0,047$ ) y un nivel bajo de información higiénica. En los participantes VIH negativos de la Isla, el porcentaje para el genotipo B fue del 91,7% y el 8,3% del genotipo A. La persona infectada por el genotipo A padecía diarrea.

En los participantes VIH positivos parasitados por *Giardia* de la Región Continental se identificó el genotipo B en el 92,3% y el genotipo A en el 7,7%. Este último caso se dio en una persona que padecía de sintomatología intestinal inespecífica. En el grupo de los participantes VIH negativos la proporción de la infección por el genotipo B fue del 87,5%, mientras que para el genotipo A fue del 12,5%. En los participantes VIH negativos el genotipo B se asoció al género ( $p=0,05$ ), siendo mayor en los varones, y el genotipo A no presentó síntomas.

En este trabajo, el genotipo B ha aparecido como predominante, al igual que en otros estudios realizados en el mundo. Amar *et al.* (2002) encontró un 64,0% de infección por *Giardia* genotipo B, el 27% para el A y el 9% de infecciones mixtas; en el estudio

realizado por Haque *et al.* (2005), el predominio fue igualmente para el genotipo B del que encontró 231 casos, frente a 20 del genotipo A y 16 de infecciones mixtas. En España el porcentaje para el genotipo B fue del 84,7% en Zaragoza y del 95,1% en León (Goñi *et al.*, 2010) y en Guatemala fue del 63,6%; un 20,5% para el AII y el 15,9% para AII+B (Aldana *et al.*, 2011). Es interesante observar que Foronda *et al.* (2008) reportaron, en un estudio realizado en Egipto, un 80% de muestras pertenecientes al genotipo B, un 15% de muestras humanas con genotipo E, que es considerado exclusivo del ganado y un 5% de genotipo A; este hallazgo podría explicar el potencial zoonótico de *Giardia*.

Por otra parte, las manifestaciones clínicas de la giardiosis varían desde una infección asintomática a la diarrea crónica con malabsorción. Los factores de riesgo de la infección por *Giardia* no se conocen bien, pudiéndose atribuir el desconocimiento a la variación en la virulencia de las cepas de *Giardia*, a las diferencias en los factores asociados al huésped como puede ser su respuesta inmune, o a la combinación de ambos factores (Thompson, 2000).

En nuestro estudio, todos los casos asintomáticos correspondieron al genotipo B y a pacientes con genotipos mixtos. Los que presentaban síntomas intestinales, así como diarrea eran los infectados por el genotipo A. Hay autores que han encontrado una relación entre la infección y la sintomatología (Homan & Mank, 2001), asociando las diarreas leves e intermitentes al genotipo A y las diarreas severas y persistentes al genotipo B. Otros han encontrado una fuerte correlación entre el genotipo A y la infección sintomática, y entre el genotipo B y la infección asintomática (Read *et al.*, 2002; Haque *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Sahagún *et al.* (2008) observaron que el 50,9% de los pacientes que presentaban sintomatología pertenecían al genotipo AII, y que dicha relación era estadísticamente significativa.

Revisando las asociaciones entre los genotipos encontrados y los factores sociodemográficos, la asociación entre el genotipo B con niveles bajos de información higiénica viene a justificar lo ya descrito por otros autores, cuando comentan que la infección por *Giardia* está asociada a condiciones sanitarias deficientes, a la calidad del agua y al hacinamiento (Smith *et al.*, 2006), y que su prevalencia está relacionada con los hábitos higiénicos de la población (Ortiz *et al.*, 2001). El análisis en paralelo por otros miembros del grupo (García *et al.*, comunicación personal) de muestras de agua

correspondientes a los ríos Borabecho y San Nicolás y tres muestras de agua de red o pozo de la ciudad de Malabo, muestra la presencia de DNA de *Giardia* genotipo B en el Río San Nicolás y en las tres muestras de agua de red o pozo. Esto sugiere que la transmisión de *Giardia* a la población puede estar ocurriendo por vía hídrica. Esto explica también el alto nivel de positivos encontrados por PCR en muestras negativas por microscopía o ICR, que podrían ser debidas a una muy baja presencia de quistes o a que estos se encuentren muy deteriorados haciendo que no sean detectados por microscopía.

En el grupo de participantes VIH negativos de la Región Continental, se observó asociación significativa ( $p=0,05$ ) entre la infección por *Giardia* genotipo B y género, siendo mayor la infección en los varones. Se conoce que esta parasitosis se puede transmitir por los alimentos produciendo brotes en restaurantes por vegetales contaminados, por un manipulador infectado (Mintz *et al.*, 1993), o por el hielo añadido a las bebidas. También es posible su transmisión por las moscas (Rendtorff *et al.*, 1954; Doiz *et al.*, 2000; Graczyk *et al.*, 2003) después de que hayan estado en contacto con heces humanas o de animales y posteriormente contaminan los alimentos. Está igualmente descrita la actividad sexual oro-anal como mecanismo de transmisión de la giardiosis (Meyer *et al.*, 1979). Estos factores pueden colaborar en la justificación sobre la asociación encontrada entre esta parasitosis y género en el contexto estudiado.

Las personas VIH positivas presentan mayor riesgo de adquirir la infección por *Giardia* genotipo B que las personas VIH negativas en la Región Continental. Se sabe que las personas más susceptibles son los niños, especialmente los menores de 10 años, los viajeros a zonas de alta endemicidad y los inmunodeprimidos, aunque la giardiosis en los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana no produce los cuadros intensos que se observan en otros protozoos como *Cryptosporidium*.

Respecto a las técnicas utilizadas para el diagnóstico de *Giardia*, los resultados obtenidos demuestran que la técnica que mayor número de casos ha podido detectar es la PCR, aunque la complejidad de esta técnica y el hecho de que se haya tenido que utilizar la amplificación de varios genes, hacen que resulte una técnica compleja, cara y que precisa de más tiempo. La microscopía, siempre considerada como “gold standard”, proporciona una buena sensibilidad, pero hay que considerar que los casos con bajo número de quistes, o en que estos se encuentren muy deteriorados, escapan a la

detección. Finalmente, aunque con menor sensibilidad que las dos anteriores, la técnica de ICR proporciona una buena concordancia con las dos técnicas anteriores para ser considerada como técnica rápida y económica de cribaje o confirmación, en la línea de los trabajos realizados en la valoración del test utilizado (Goñi *et al.*, 2012).

El análisis de las secuencias obtenidas ha mostrado la presencia de picos dobles en los cromatogramas tanto de las secuencias correspondientes al genotipo A como al B, sugiriendo la presencia de infecciones mixtas intragenotipo o la presencia de múltiples alelos correspondientes a un mismo aislamiento (Kosuwin *et al.*, 2010). Esto ha impedido que se pueda llevar a cabo un estudio multilocus puesto que solamente con una de las muestras han amplificado varios genes.

Este es el primer estudio de genotipificación de *Giardia* que se ha llevado a cabo en Guinea Ecuatorial, por lo que representa una base y abre una vía para posteriores estudios.



***CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA  
GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia duodenalis* POR  
TÉCNICAS MOLECULARES***

---



## 15. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE *Giardia duodenalis* POR TÉCNICAS MOLECULARES

### 15.1 Conclusiones

- Los genotipos de *Giardia duodenalis* identificados en este estudio corresponden a los genotipos A (3,1%), B (93,8%) y a la combinación A+B (3,1%), siendo el genotipo B el aislado con más frecuencia, independientemente del sexo, edad, lugar de residencia o estado inmunológico.
- Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Giardia duodenalis* genotipo B y el bajo nivel de información higiénica, así como con el género.
- Las personas VIH positivas de la Región Continental presentan un 68,0% más de riesgo de adquirir la infección por *Giardia* genotipo B que los VIH negativos.
- Las secuencias obtenidas sugieren la presencia de infecciones mixtas intragenotipo y presentan homologías entre el 97-100% con las secuencias de referencia registradas en el GenBank.

### 15.2 Recomendaciones

Este es el primer estudio de genotipificación de *Giardia* que se ha llevado a cabo en Guinea Ecuatorial, por lo que representa una base y abre un camino para posteriores estudios, que nos lleven a poder identificar las posibles vías de su transmisión en la población y poner en marcha medidas de salud pública para evitar su infección en la población, sobre todo, en los niños y en las PVVIH.



## **CAPÍTULO 8: *CONCLUSIONES GENERALES***



***CONCLUSIONES GENERALES***

---



## 16. CONCLUSIONES GENERALES

- 16.1 Los parásitos intestinales que más afectan a la población guineo-ecuatoriana y que aparecen como un gran problema de salud pública a nivel nacional son: *Trichuris trichiura*, seguido de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, *Ascaris lumbricoides* y *Giardia duodenalis*. Las zonas donde se registran mayor proporción de infecciones parasitarias intestinales son los cinturones urbanos, siendo el de Malabo el más afectado.
- 16.2 En la Isla de Bioko emerge la infección por *Schistosoma intercalatum/ guineensis*, nunca descrito como autóctono en esta región, en elevados niveles (11,0%). No obstante, la observación de las características morfológicas de los huevos no permite asegurar si la especie presente es *S. intercalatum*, *S. guineensis*, una mezcla de ambas o un híbrido entre las dos especies o con *S. haematobium*.
- 16.3 Las altas proporciones detectadas de parásitos intestinales en los participantes VIH positivos y VIH negativos, sólo pueden explicarse por las influencias de factores ambientales (hacinamiento, agua, alimentos, contacto con animales) y de higiene personal deficientes.
- 16.4 *E. histolytica* fue la especie que resultó minoritaria, comparada con *E. dispar* y *E. moshkovskii*, y se identificó en mayor proporción en participantes de la Isla de Bioko que en la Región Continental.
- 16.5 La alta prevalencia que muestra la infección por *E. moshkovskii* en los participantes de esta investigación puede indicar, que los seres humanos pueden ser verdaderos hospedadores para esta ameba inicialmente considerada como ameba de vida libre. Este hecho sugiere la necesidad de cambiar la nomenclatura de *Entamoeba histolytica/dispar* por una más ampliada que contenga esta especie: *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, como recomiendan algunos autores.
- 16.6 Tres han sido las especies de *Cryptosporidium* identificadas en Guinea Ecuatorial: *C. hominis* como especie mayoritaria, indicando la importancia de la transmisión antroponótica, *C. parvum*, y *C. suis*. Además, y por primera vez, se han identificado ocho subtipos de *Cryptosporidium*, tres de ellos (IbA10G2R2, IbA9G3R2 y IbA8G4,) han sido encontrados y descritos previamente en otros países, mientras

que los otros cinco (IbA9G2T1R2, IbA4G1T1, IeA11G3T3R1, IaA18G3R1 y IIaA8G3) se describen por primera vez.

16.7 Los genotipos de *Giardia duodenalis* identificados en este estudio corresponden a los genotipos A, B y a la combinación A+B, siendo el genotipo B el aislado con más frecuencia, independientemente del sexo, edad, lugar de residencia o estado inmunológico.

16.8 La probabilidad de parasitismo por *Trichuris*, uncinarias, *C. hominis*, *E. dispar* y *E. histolytica* es mayor en las personas que viven con el VIH/SIDA. Además, la probabilidad de adquirir la infección por *E. dispar* y *E. histolytica* es mayor en los de la Isla y la de *E. dispar* y *Giardia* genotipo B en los de la Región Continental.

Para terminar, esta investigación constituye el estudio más extenso realizado en Guinea Ecuatorial sobre parásitos intestinales en la población VIH-positiva, así como el primer estudio que se lleva a cabo en Guinea Ecuatorial sobre la distribución de especies de *E. histolytica/dispar/moshkovskii* y que incluye la primera descripción de *E. moshkovskii*, tanto en el país como en la subregión del África Central. También se describen por primera vez los genotipos circulantes de *Giardia duodenalis* y se realiza la primera descripción en humanos de *Cryptosporidium suis* en el país.



## **CAPÍTULO 9: *BIBLIOGRAFÍA***



***BIBLIOGRAFÍA***

---



## 17. BIBLIOGRAFÍA

- Adam RD. **1991**. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev.* 55 (4): 706-32.
- Aldana E, Goñi P, Clavel A, Cancinos de Orantes B, Buera L. **2011**. Identificación de genotipos de *Giardia duodenalis* en niños del área urbana de Guatemala. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70 (1): 25-28.
- Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. **2008**. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol.* 8 (5): 698-707.
- Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA Jr, Haque R, Clark CG. **2003**. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*; 9: 580-584.
- Ali IK, Zaki M, Clark CG. **2005**. Use of PCR amplification of *tRNA* gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 43 (12): 5842-7.
- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. **2003**. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 41 (6): 2744-7.
- Amar CF, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. **2002**. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol.* 40 (2): 446-52.
- Anonymous. **1997**. *Amoebiasis*. *Wkly Epidemiol Rec.* 72:97-99.
- Arendt V y col. **2007**. AMATA study: effectiveness of antiretroviral therapy in breastfeeding mothers to prevent post-natal vertical transmission in Rwanda. Fourth International AIDS Society Conference, Sydney, Australia, 22-25 July.
- Ash LR y Orihel TC. **2010**. Atlas de parasitología humana. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. S.A. Pág. 197-203, 217-226.
- Assefa S, Erko B, Medhin G, Assefa Z, Shimelis T. **2009**. Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. *BMC Infect Dis.* 18; 9: 155.
- Awasthi S, Bundy DA, Savioli L. **2003**. Helminthic infections. *BMJ.* 23; 327 (7412): 431-3.
- Awole M, Gebre-Selassie S, Kassa T, Kibru G. **2003**. Prevalence of intestinal parasites in HIV-Infected adult patients in southwestern Ethiopia. *Ethiop J Health.* 17: 71-8.
- Ayed SB, Aoun K, Maamouri N, Abdallah RB, Bouratbine A. **2008**. First molecular identification of *Entamoeba moshkovskii* in human stool samples in Tunisia. *Am J. Trop Med Hyg.* 79 (5): 706-7.

Babatunde SK, Salami AK, Fabiyi JP, Agbede OO, Desalu OO. **2010**. Prevalence of intestinal parasitic infestation in HIV seropositive and seronegative patients in Ilorin, Nigeria. *Ann Afr Med* . 9 (3): 123-8.

Barta J and R Thompson. **2006**. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol*. 22 (10): 463-468.

Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. **1996**. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis*. 174: 233–6.

Beck DL, Doğan N, Maro V, Sam NE, Shao J, Houpt ER. **2008**. High prevalence of *Entamoeba moshkovskii* in a Tanzanian HIV population. *Acta Trop*. 107 (1): 48-9.

Bergquist R, Johansen MV, Utzinger J. **2009**. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends Parasitol*; 25: 151–156.

Blanco, MA., Iborra, A., Vargas, A., Nsie, E., Mbá, L., Fuentes, I. **2009**. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Equatorial Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 103 (12): 1282-4.

Borowski H, Clode P and R Thompson. **2008**. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol*. 24 (11): 509-16.

Brooker S, Clements AC, Bundy DA. **2006**. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*. 62: 221-61.

Cabada MM, White AC Jr. **2010**. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Curr Opin Infect Dis*. 23 (5): 494-9.

Caccio SM, De Giacomo M, Pozio E. **2002**. Sequence analysis of the *beta-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 32: 1023–1030.

Cacciò SM, Pozio E. **2006**. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 4 (3): 429-43.

Cacciò SM. **2005**. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*. 47 (2): 185-92.

CDC. Consultada 25-junio-2012. Disponible en:

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/strongyloidiasis.htm>

Cama V, Gilman RH, Vivar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, Xiao L. **2006**. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg Infect Dis*. 12 (6): 1025-8.

Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. **2007**. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis*. 1; 196 (5): 684-91.

- Caputo C, Forbes A, Frost F, Sinclair MI, Kunde TR, Hoy JF, Fairley CK. **1999**. Determinants of antibodies to *Cryptosporidium* infection among gay and bisexual men with HIV infection. *Epidemiol. Infect.* 122: 291- 297.
- Certad G, Arenas-Pinto A, Pocaterra L, Ferrara G, Castro J, Bello A, Nuñez L. **2003**. Isosporiasis in Venezuelan adults infected with human immunodeficiency virus: Clinical characterization. *Am Trop Med Hyg.* 69: 217- 222.
- Chacín-Bonilla L, Panunzio AP, Monsalve-Castillo FM, Parra-Cepeda IE, Martínez R. **2006**. Microsporidiosis in Venezuela: Prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of Human Immunodeficiency Virus-infected patients from Zulia State. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 482-486.
- Chacín-Bonilla L, Cheng-NG R. 2008. Criptosporidiosis en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. *INCI.* vol.33, no.10, p.708-716. ISSN 0378-1844.
- Chacin-Bonilla L. **2010**. Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. *Invest. Clín.* vol. 51, no.2, p.239-256. ISSN 0535-5133.
- Chalmers RM, Campbell B, Crouch N, Charlett A, Davies A. **2011**. Comparison of the diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the United Kingdom. *J Med Microbiol.* doi: 10.1099/jmm0.034181.0.
- Chalmers R, Jackson C, Elwin K, Hadfield S, Hunter P. **2007**. Investigation of genetic variation with in *Cryptosporidium hominis* for epidemiological purposes. DWI 70/2/199 (851). Consultada 22-junio-2012. Disponible en: <http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/0851.pdf>
- Chalmers RM, Robinson G, Elwin K, Hadfield SJ, Xiao L, Ryan U, Modha D, Mallaghan C. **2009**. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg Infect Dis.* 15 (5): 829-30.
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. **2000**. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 23; 77 (1): 41-51.
- Cieloszyk J, Goñi P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A. **2012**. Two cases of zoonotical cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.* Jun 22. [Epub ahead of print].
- Clark CG, Diamond LS. **1991**. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol.* 46: 11-18.
- Clavel A, Arnal AC, Sánchez EC, Ramírez de Ocariz I, Varea M, Castillo FJ & Quilez J. **1994**. Morphological and staining alterations of *Cryptosporidium* oocysts contained in 10 % formalin-preserved faeces. *Research and Reviews in Parasitology*, 54 (4): 273-275.
- Clavel A, Doiz O, Morales S, Varea M, Seral C, Castillo FJ, Fleta J, Rubio C, Gómez-Lus R. **2002**. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol (Praha).* 49 (2): 163-4.

Crompton DW. **1999**. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol.* 85 (3): 397-403.

Current W and C Reese. **1986**. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool.* 33 (1): 98-108.

Current W and L Garcia. **1991**. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 4 (3): 325-58.

Damen JG, Luka J, Biwan EI, Lugos M. **2011**. Prevalence of Intestinal Parasites among Pupils in Rural North Eastern, Nigeria. *Niger Med J.* 52 (1): 4-6.

De la Parte-Pérez M, Brito A. **2004**. Frecuencia de *Cryptosporidium* en pacientes adultos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y diarrea. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24: 4-12.

De Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. **2003**. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 19 (12): 547-51.

DeHovitz JA, Pape JW, Boncy M, Johnson WD Jr. **1986**. Clinical manifestations and therapy of *Isoospora belli* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.* 315: 87-90.

Diamond LS, Clark CG. **1993**. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol;* 40: 340-344.

Doiz O, Clavel A, Morales S, Varea M, Castillo FJ, Rubio C, Gómez-Lus R. **2000**. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Giardia lamblia*. *Folia Parasitol (Praha).* 47 (4): 330-1.

Dumba R, Kaddu JB, Wabwire Mangen F. **2008**. Intestinal helminths in Luweero district, Uganda. *Afr Health Sci.* 8: 90-96.

Egger M, May M, Chene G, *et al.* **2002**. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet.* 360 (9327): 119-129.

Ekdahl K, Andersson Y. **2005**. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg.* 72 (6): 825-30.

el-Shewy K, Kilani RT, Hegazi MM, Makhoul LM, Wenman WM. **1994**. Identification of low-molecular-mass coproantigens of *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis.* 169 (2): 460-3.

Equatorial Guinea. Factsheets of health statistics. **2010**. WHO Regional Office in África. Consultada 4-mayo-2012. Disponible en: [www.afro.who.int](http://www.afro.who.int).

Ethelberg S, Lisby M, Vestergaard L, Enemark H, Olsen K, Stensvold C, Nielsen H, Porsbo L, Plesner A and K Mølbak. **2009**. A foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. *Epidemiol Infect.* 137 (3): 348-56.

- Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N. **2000**. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol*. 94 (3): 233-40.
- Ey PL, Andrews RH, Maryhofer G. **1993**. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology*. 106:347-56.
- Farthing MJG. **1994**. Giardiasis as a disease. In: Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ, eds. *Giardia: from molecules to disease*. Wallingford, England, CAB International: 15-37.
- Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaro R, Brites C. **2001**. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 5:339-44.
- Feng X, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. **2007**. Characterization of subtilase protease in *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *J Parasitol*. 93 (3): 619-26.
- Flanagan PA. **1992**. *Giardia*--diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol Infect*. 109 (1): 1-22.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. **2007**. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol*. 45:1035-1037.
- Fuentes, I. - Iborra, A. - Blanco Méndez, M.A. - Vargas, A. - Sánchez, I. - Gutiérrez, M.J. - Mbasogo, S. - Obama, C. **2007**. Detección de los protozoos *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba histolytica* en Guinea Ecuatorial. *ACTAS DEL X CONGRESO IBÉRICO DE PARASITOLOGÍA* (CIP 10), Servicio de Publicaciones. Universidad Complutense de Madrid. ISBN 978-84-96704-04-6.
- Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwati SK, Revathi G, Hart CA. **2006**. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 75 (1): 78-82.
- Gatti S, Cevini C, Bruno A, Novati S, Scaglia M. **1995**. Transmission of *Entamoeba histolytica* within a family complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 89 (4): 403-5.
- Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JS, Lal AA, Xiao L. **2002**. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis*. 8 (6): 631-3.
- Global Fund. **2011**. Results are harmonized with partners to avoid double counting and are released twice a year. Consultada: 10-enero-2012. Disponible en: <http://portfolio.theglobalfund.org/en/Country/Index/GNQ>.
- Gomez-Morales MA, Atzori C, Ludovisi A, Rossi P, Scaglia M, Pozio E. **1995**. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhea in Tanzania. *Trop Med Parasitol*. 46:109-114.

Goñi P, Aldana DE, Clavel A, Seral C, Remacha MA, Castillo FJ. **2010**. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 28 (10): 710-2.

Goñi P, Martín B, Villacampa M, García A, Seral C, Castillo FJ, Clavel A. **2012**. Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jan 20.

Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. **2003**. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg*. 68 (2): 228-32.

Guía de práctica clínica en seguimiento y tratamiento de adultos/adolescentes viviendo con el VIH/SIDA en Guinea Ecuatorial. **2010**. MINSABS.

Guía Terapéutica práctica para el manejo clínico de personas que viven con el VIH/SIDA en Guinea Ecuatorial. **2009**. MINSABS.

Gutiérrez-Cisneros MJ, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino FJ, Millán R, Fuentes I. **2011**. Assessment of two commercially available immunochromatographic assays for a rapid diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29 (3): 201-3.

Gutiérrez-Cisneros, MJ. **2008**. Amebiasis en España: diagnóstico molecular y Estudio epidemiológico de una parasitosis Emergente. ISBN: 978-84-692-0156-5, Tesis doctoral, Madrid.

Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, Ota F. **2004**. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis*. 57 (2): 41-3.

Haque R, Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. **1998**. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitol Int*. 47:201-202.

Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. **1995**. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol*. 33:2558-61.

Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. **2005**. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis*. 15; 192 (12): 2171-3.

Harms G, Feldmeier H. **2002**. HIV infection and tropical parasitic diseases - deleterious interactions in both directions? *Trop Med Int Health*. 7 (6): 479-88.

Henriksen S, Pohlenz J. **1981**. Staining *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand*. 22: 594-596.

Heyworth MF. **1996**. Parasitic diseases in immunocompromised hosts. Cryptosporidiosis, isosporiasis, and strongyloidiasis. *Gastroenterol Clin North Am*. 25 (3): 691-707.

HIV/AIDS Programme Strengthening health services to fight HIV/AIDS. **2007**. Who case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. WHO; ISBN 9789241595629. Consultada 3-noviembre-2011. Disponible en: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/HIVstaging150307.pdf>.

Homan WL, Mank TG. **2001**. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 31 (8): 822-6.

Hotez PJ, Bundy DAP, Beegle K, Brooker S, Drake L, de Silva N, Montresor A, Engels D, Jukes M, Chitsulo L, Chow J, Laxminarayan R, Michaud C, Bethony J, Correa-Oliveira R, Shuhua X, Fenwick A, Savioli L. **2006**. Helminth Infections: Soil-transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editors. Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition. Washington (DC): World Bank; Chapter 24.

Haupt ER, Bushen OY, Sam NE, Kohli A, Asgharpour A, Ng CT, Calfee DP, Guerrant RL, Maro V, Ole-Nguyaine S, Shao JF. **2005**. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg.* 73 (3): 520-2.

Hunter G, Bagshawe AF, Baboo KS, Luke R, Provic P. **1992**. Intestinal parasites in Zambien patients with AIDS. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 86:543-545.

Hunter P, Hadfield S, Wilkinson D, Lake I, Harrinson F and R Chalmers. **2007**. Subtype of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Inf Dis.* 13: 82-8.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, Morgan K, Nichols G, Beeching N, Osborn K. **2004**. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerg Infect Dis.* 10 (7): 1241-9.

Hunter PR, Nichols G. **2002**. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 15 (1): 145-54.

Indicadores Internacionales sobre Desarrollo Humano. Consultada 5-mayo-2012. Disponible en: <http://hdrstats.undp.org/es/paises/perfiles/GNQ.html>

Iqbal A, Lim YA, Surin J, Sim BL. **2012**. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One.* 7 (2): e31139.

Islam A. **1990**. Giardiasis in developing countries. In: Meyer EA, ed. Human parasitic diseases. Vol. 3, Giardiasis. Amsterdam, Elsevier: 235-266.

Janoff EN, Reller LB. **1987**. *Cryptosporidium* Species, a Protean Protozoan. *J. Clin. Microbiol.* 25: 967-975.

Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Whipp M, Hogg G, Sinclair MI, Stevens M, Gasser RB. **2008**. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *J Clin Microbiol.* 46 (7): 2252-62.

Jex AR, Gasser RB. **2010**. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review. *Biotechnol Adv.* 28 (1): 17-26.

Joshi M, Chowdhary AS, Dalal PJ, Maniar JK. **2002**. Parasitic diarrhoea in patients with AIDS. *Natl Med J India.* 15 (2): 72-4.

Jusot JF, Simarro PP, De Muynck A. **1997**. *Schistosoma intercalatum* bilharziasis: clinical and epidemiological considerations. *Med Trop.* 57 (3): 280-8.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. **2007**. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 5 (1): 1-38.

Kilewo C, Karlsson K, Ngarina M, Massawe A, Lyamuya E, Swai A, Lipyoga R, Mhalu F, Biberfeld G. **2009**. Mitra Plus Study Team. Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breastfeeding by treating mothers with triple antiretroviral therapy in Dar es Salaam, Tanzania: the Mitra Plus study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1; 52 (3): 406-16.

Kosuwin R, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. **2010**. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene.* 1; 449 (1-2): 1-8.

Kulkarni SV, Kairon R, Sane SS, Padmawar PS, Kale VA, Thakar MR, Mehendale SM, Risbud AR. **2009**. Opportunistic parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea by the level of immunosuppression. *Indian J Med Res.* 130 (1): 63-6.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. **2005**. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardiaduodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 35 (2): 207-13.

Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. **2006**. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol.* 55 (Pt 6): 703-7.

Lim YA, Iqbal A, Surin J, Sim BL, Jex AR, Nolan MJ, Smith HV, Gasser RB. **2011**. First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Infect Genet Evol.* 11 (5): 968-74.

Llorente MT, Clavel A, Varea M, Olivera S, Castillo FJ, Sahagún J, Rubio MC, Gómez-Lus R. **2002**. Evaluation of an immunochromatographic dip-strip test for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21 (8): 624-5.

Llorente MT, Clavel A, Varea M, Pilar Goñi M, Sahagún J, Olivera S. **2006**. *Cryptosporidium felis* infection, Spain. *Emerg Infect Dis.* 12 (9): 1471-2.

- MacKenzie W, Hoxie N, Proctor M, Stephen Gradus M, Blair K, Peterson D, Kazmierczak J, Addiss D, Fox K, Rose J and J Davis. **1994**. Massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. 331 (15): 161-7.
- Maggi P, Larocca AM, Quarto M, Serio G, Brandonisio O, Angarano G, Pastore G. **2000**. Effect of antiretroviral therapy on cryptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19 (3): 213-7.
- Mariam ZT, Abebe G, Mulu A. **2008**. Opportunistic and other intestinal parasitic infections in AIDS patients, HIV seropositive healthy carriers and HIV seronegative individuals in southwest Ethiopia. *East Afr J Public Health*. 5 (3): 169-73.
- McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Díaz S and G Nichols. **2000**. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*. 38: 3984-90.
- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. **1997**. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 126 (12): 946-954.
- Meyer EA, Radulescu S. **1979**. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*. 17: 1-47.
- Miao YM, Awad-El-Kariem FM, Franzen C, Ellis DS, Müller A, Counihan HM, Hayes PJ, Gazzard BG. **2000**. Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1; 25 (2): 124-9.
- Ministerio de Planificación y Desarrollo Económico. Dirección General de Estadística y Cuentas Nacionales. III CENSO GENERAL DE POBLACION Y VIVIENDAS 2001 (estimación para 2010). Consultada 4-mayo-2012. Disponible en: <http://www.guineaecuatorialpress.com/estadistica.php>.
- Ministerio de Sanidad y Bienestar Social. **2009**. Protocolo de prevención de la transmisión materno infantil del VIH. 1st Ed. Malabo. *MINSABS*.
- Moghaddam A. **2007**. Symptomatic and asymptomatic cryptosporidiosis in young children in Iran. *Pak J Biol Sci*. 10: 1108-12.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. **1999**. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*. 16:1135-44.
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. **1996**. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology*. 112:1-12.
- Montresor A, Stoltzfus RJ, Albonico M, Tielsch JM, Rice AL, Chwaya HM, Savioli L. **2002**. Is the exclusion of children under 24 months from anthelmintic treatment justifiable? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 96 (2): 197-9.
- Mor SM, Tzipori S. **2008**. Cryptosporidiosis in Children in Sub-Saharan Africa: A Lingering Challenge. *Clin Infect Dis*. 47 (7): 915-921.

Moran P, Ramos F, Ramiro M, Curiel O, González E, Valadez A, Gómez A, García G, Melendro EI, Ximénez C. **2005**. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV+/AIDS patients in Mexico city. *Exp Parasitol*. 110 (3): 331-4.

Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RC, Ndiritu W, Lal A, Moore A, Deplazes P. **2000**. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol*. 38: 1180-1183.

Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Elliot A, Thompson RC. **1998**. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*. 117 (Pt 1): 31-7.

Morse TD, Nichols RA, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV. **2007**. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol Infect*. 135 (8): 1307-15.

Moura H, Fernandes O, Viola SPB, Silva SP, Passos RH, Lima DB. **1989**. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 84: 527-533.

Nazemalhosseini Mojarad E, Nochi Z, Sahebekhtiari N, Rostami Nejad M, Dabiri H, Zali MR, Kazemi B, Haghghi A. **2010**. Discrimination of *Entamoeba moshkovskii* in patients with gastrointestinal disorders by single-round PCR. *Jpn J Infect Dis*. 63 (2): 136-8.

Newman RD, Jaeger KL, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. **1993**. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *J Clin Microbiol*. 31 (8): 2080-4.

Nissapatorn V, Sawangjaroen N. **2011**. Parasitic infections in HIV infected individuals: Diagnostic & therapeutic challenges. *Indian J Med Res*. 134 (6): 878-97.

Observatorio Mundial de la Salud. **2009**. Consultada 4-mayo-2012. Disponible en: <http://apps.who.int/ghodata/>

Olsen A, Samuelsen H, Onyango-Ouma W. **2001**. A study of risk factors for intestinal helminth infections using epidemiological and anthropological approaches. *J Biosoc Sci*. 33:569-584.

Ortega M, Vergara A, Guimbao J, Clavel A, Gavín P y A Ruiz. **2006**. Brote de diarrea y transmisión de *Cryptosporidium hominis* asociados al uso de pañal en niños. *Med Clin (Barc)*. 127 (17): 653-6.

Ortiz JJ, Ayoub A, Gargala G, Chegne NL, Favennec L. **2001**. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Aliment Pharmacol Ther*. 15 (9): 1409-15.

Osterholm MT, Forfang JC, Ristinen TL, Dean AG, Washburn JW, Godes JR, Rude RA, McCullough JG. **1981**. An outbreak of foodborne giardiasis. *N Engl J Med*. Jan 1; 304 (1): 24-8.

Paglia MG, Visca P. **2004**. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. *Acta Trop.* 92 (3): 273-7.

Pangasa A, Jex AR, Nolan MJ, Campbell BE, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. **2010**. Highly sensitive non-isotopic restriction endonuclease fingerprinting of nucleotide variability in the gp60 gene within *Cryptosporidium* species, genotypes and subgenotypes infective to humans, and its implications. *Electrophoresis.* 31 (10): 1637-47.

Parija SC, Khairnar K. **2005**. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in pondicherry, India. *J Health Popul Nutr.* 23 (3): 292-5.

Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD. **1996**. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin. Med.* 72: 128-131.

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura IN, Arrowood MJ, Ditrich O, Addiss DG. **1999**. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV infected persons. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 444-449.

Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hänninen M, Kaarna A, Meri T and M Kuusi. **2009**. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki. *Eurosurveillance.* 14 (28): 1- 3.

Pritt BS, Clark CG. **2008**. Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* 83 (10): 1154-9; quiz 1159-60.

Protocolo de diagnóstico y seguimiento por laboratorio del VIH/SIDA en Guinea Ecuatorial. **2009**. MINSABS.

Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). Guidelines for drinking-water quality. WHO. Disponible en:

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/en/admicrob5.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/admicrob5.pdf)

Proyecto de Reforzamiento de las capacidades y competencias nacionales de gestión de las actividades y servicios integrados de lucha contra el VIH/SIDA. Annual Report, January to December **2008**. *Global Fund HIV Grant GNQ-405-G01- H. Equatorial Guinea.*

R. Salvatella y C. Eirale. **1996**. Examen coproparasitario. Metodología y empleo. Revisión técnico metodológica. *Rev. Med. Uruguay;* 12: 215-223.

Rabbani GH, Islam A. 1994. Giardiasis in humans: populations most at risk and prospects for control. In: Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ, eds. *Giardia: from molecules to disease.* Wallingford, England, CAB International. 217-249.

Ramana KV, Mohanty SK. **2009**. Opportunistic intestinal parasites and TCD4+ cell counts in human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Med Microbiol.* 58 (Pt 12): 1664-6.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. **2002**. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 32 (2): 229-31.

Registro de secuencias. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Rendtorff RC, Holt CJ. **1954**. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. III. Attempts to transmit *Entamoeba coli* and *Giardia lamblia* cysts by flies. *Am J Hyg.* 60 (3): 320-6.

Rendtorff RC. **1954**. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 59 (2): 209-20.

Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. **2008**. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 14 (11): 1800-2.

Robinson RD, Lindon JF, Neva FA. **1990**. Interaction between HTLV-I and *S. stercoralis* infection resulting lower IGE levels in Jamaica. *W Ind Med J.* 39:35-7.

Roche J, Benito A. **1999**. Prevalence of intestinal parasite infections with special reference to *Entamoeba histolytica* on the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Am J Trop Med Hyg.* 60 (2): 257-62.

Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R. **2008**. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27 (1): 81-3.

Samie A, Obi LC, Bessong PO, Stroup S, Houpt E, Guerrant RL. **2006**. Prevalence and species distribution of *E. Histolytica* and *E. Dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 75 (3): 565-71.

Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Gbadegeshin AH, Iriemenam NC. **2011**. Comparative study of entero-parasitic infections among HIV sero-positive and sero-negative patients in Lagos, Nigeria. *Acta Trop.* 120 (3): 268-72.

Sarfati C, Bourgeois A, Menotti J, Liegeois F, Moyou-Somo R, Delaporte E, Derouin F, Ngole EM, Molina JM. **2006**. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg.* 74 (1): 162-4.

Savioli L, Smith H, Thompson A. **2006**. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 22 (5): 203-8.

Scaglia M, Gatti S, Strosselli M, Grazioli V, Villa MR. **1983**. *Entamoeba moshkovskii* (Tshalaia, 1941): morpho-biological characterization of new strains isolated from the environment, and a review of the literature. *Ann Parasitol Hum Comp.* 58:413-422.

Scowden EB, Schaffner W, Stone WJ. **1978**. Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. *Medicine (Baltimore).* 57 (6): 527-44.

Segarra-Newnham M. **2007**. Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. *Ann Pharmacother.* 41: 1992–2001.

Siddiqui U, Bini EJ, Chandarana K, Leong J, Ramsetty S, Schiliro D, Poles M. **2007**. Prevalence and impact of diarrhea on health-related quality of life in HIV-infected

patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Gastroenterol.* 41: 484-90.

Simarro PP, Ndong P, Mir M, Nguem E. **1993.** Urban schistosomiasis in Equatorial Guinea. *Res Rev Parasitol.* 53: 93–95.

Simarro PP, Sima FO, Mir M, Ndong P. **1991.** Effect of repeated targeted mass treatment with praziquantel on the prevalence, intensity of infection and morbidity due to *Schistosoma intercalatum* in an urban community in Equatorial Guinea. *Trop Med Parasitol.* 42 (3): 167-71.

Singh A, Houpt E, Petri WA. **2009.** Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009:547090. Epub 2009 Jun 25. PubMed PMID: 19584941; PubMed Central PMCID: PMC2703877.

Singh S. **2002.** Human strongyloidiasis in AIDS era: its zoonotic importance. *J Assoc Physicians India.* 50:415-22.

Siwila J, Phiri I, Vercruyse J, Goma F, Gabriel S, Claerebout E and T Geurden. **2007.** Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101: 733-4.

Smith HV, Cacciò SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. **2006.** Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 22 (4): 160-7.

Smith R, Chalmers R, Elwin K, Clifton-Hadley F, Mueller-Doblies D, Watkins J, Paiba G and M Giles. **2009.** Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health.* 56 (1): 24-3.

Smith, H.V., Grimason, A.M., **2003.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: Mara, D., Horan, N. (Eds.), *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology.* Elsevier Science Limited, Oxford, UK, pp. 619–781.

Soliman RH, Fuentes I, Rubio JM. **2011.** Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol Int.* 60 (4): 507-11.

Sorvillo FJ, Lieb LE, Kerndt PR, Ash LR. **1994.** Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 326-331.

Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan U, Le Blancq S, Tchack L, Tzipori S and G Widmer. **1998.** Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J Clin Microbiol.* 36 (11): 3255-9.

Stanley SL Jr. **2003.** Amoebiasis. *Lancet.* 22; 361 (9362): 1025-34.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. **2006.** Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 6 (7): 411-25.

Strong WB, Gut J, Nelson RG. **2000**. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun.* 68 (7): 4117-34.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. **2003**. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 9 (11): 1444-52.

Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. **2005**. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 43 (6): 2805-9.

Sun T. **1988**. Opportunistic parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Pathol Annu.* 23 Pt 2:1-32.

Tannich E, Burchard GD. **1991**. Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol.* 29:250-255.

Tanyuksel M, Petri WA Jr. **2003**. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 16 (4): 713-29.

Tanyuksel M, Ulukanligil M, Guclu Z, Araz E, Koru O, Petri W A Jr. **2007**. Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. *Am J Trop Med Hyg.* 76:723-724.

Thompson JE Jr, Freischlag J, Thomas DS. **1983**. Amebic liver abscess in a homosexual man. *Sex Transm Dis.* 10 (3): 153-5.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL. **2000**. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today.* 16 (5): 210-3.

Thompson RC. **2000**. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 30 (12-13): 1259-67.

Thompson RC. **2004**. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 9; 126 (1-2): 15-35.

Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. **2004**. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology.* 128 (Pt 3): 253-62.

Tshalaia LE. **1941**. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Med Parazit (Moscow).* 10: 244-252.

UN DESA. Word Population Prospects: The **2008** Revision. Department for Economics and Social Affairs. Consultada 5-mayo-2012. Disponible en: [http://www.un.org/esa/population/publications/wpp2008/wpp2008\\_highlights.pdf](http://www.un.org/esa/population/publications/wpp2008/wpp2008_highlights.pdf).

UNAIDS. **2009** Report on the global AIDS epidemic. Consultada 20-abril-2012. Disponible en: [http://www.unaids.org/documents/20101123\\_GlobalReport\\_em.pdf](http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_em.pdf).

Ungar BL. **1990**. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 28 (11): 2491-5.

Valderrama A, Hlavsa M, Cronquist A, Cosgrove S, Johnston S, Roberts J, Stock M, Xiao L, Xavier K and M Beach. **2009**. Multiple risk factors associated with a large statewide increase in cryptosporidiosis. *Epidemiol Infect.* 137 (12): 1781-8.

Valentiner-Branth P, Steinsland H, Fischer TK, et al. **2003**. Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *J Clin Microbiol.* 41:4238-45.

Vreden SG, Visser LG, Verweij JJ, Blotkamp J, Stuiver PC, Aguirre A, Polderman AM. **2000**. Outbreak of amebiasis in a family in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 31 (4): 1101-4.

Walsh JA. **1986**. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* 8:228-238.

Webster BL, Southgate VR, Littlewood DT. **2006**. [A revision of the interrelationships of \*Schistosoma\* including the recently described \*Schistosoma guineensis\*](#). *Int J Parasitol.* 36 (8): 947-55.

WHO /CDS /IPI /92.2. WHO/PAHO. **1991**. Informal consultation on intestinal protozoal infections, Mexico.

WHO Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infant: toward universal access. **2006**. *World Health Organization*. Geneva

WHO. Towards Universal Access Progress Report 2008-2009. **2010**. WHO guidance. Consultada 20-abril-2012. Disponible en: <http://www.who.int/hiv/mediacentre/en/index.ht>.

World Health Organization, **2006**. Preventive Chemotherapy in Human Helminthiasis: Coordinated Use of Anthelmintic Drugs in Control Interventions: A Manual for Health Professionals and Programme Managers. World Health Organization Press, Geneva. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241547103\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241547103_eng.pdf).

World Health Organization. Department of Measurement and Health Information. February **2009**. Consultada 4-mayo-2012. Disponible en: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=720>.

Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Nakada T, Takahashi Y. **2003**. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol.* 69 (8): 4720-6.

Xiao L and U Ryan. **2008**. Molecular Epidemiology. In: R Fayer and L Xiao (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *CRC Press and IWA Publishing*, Boca Raton. FL. Pp. 119-69

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. **1999**. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*. 65 (4): 1578-83.

Xiao L, Fayer R. **2008**. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*. 38 (11): 1239-1255.

Xiao L, Limor J, Bern C, Lal AA. **2001**. Epidemic Working Group. Tracking *Cryptosporidium parvum* by sequence analysis of small double-stranded RNA. *Emerg Infect Dis*. 7 (1): 141-5.

Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. **2000**. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol. Today*. 16: 287-292.

Xiao L. **2010**. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 124 (1): 80-9.

Zulu I, Veitch A, Sianongo S, McPhail G, Feakins R, Farthing MJ, Kelly P. **2002**. Albendazole chemotherapy for AIDS-related diarrhoea in Zambia--clinical, parasitological and mucosal responses. *Aliment Pharmacol Ther*. 16 (3): 595-601.

## **CAPÍTULO 10: *ANEXOS***







## 18. ANEXOS

**Anexo 1.** Ministerio de Sanidad y Política Social, España. Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior.

16/09 2010 13:10 FAX 00000000000 S. G. SANIDAD EXTERIOR 001/002



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y POLÍTICA SOCIAL



MINISTERIO SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL  
REGISTRO GENERAL  
SALIDA  
N. de Registro: 6776 / RG 73277  
Fecha: 16/09/2010 13:16:46

DIRECCION GENERAL DE SALUD  
PUBLICA Y SANIDAD EXTERIOR

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
SANIDAD EXTERIOR

**F A X**

<b>DE:</b>	<b>SUBDIRECCIÓN GENERAL SANIDAD EXTERIOR</b>
<b>A:</b>	<b>FACULTAD DE MEDICINA, DPTO. MICROBIOLOGIA, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA.</b>  Fax:976762604
<b>CC:</b>	<b>ÁREA DEL PAIS VASCO</b>
<b>ASUNTO:</b>	<b>SOLICITUD DE IMPORTACION</b>
<b>FECHA</b>	<b>16 de Septiembre de 2010</b>



Carmen Pons Martín  
Técnico Farmacéutico

SUBDIRECCIÓN GENERAL  
DE SANIDAD EXTERIOR

saniext@msps.es

Pº DEL PRADO, 18-20  
28014 MADRID  
TEL: +34-91 546 2038/40  
FAX: +34-91 560 1343



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y POLÍTICA SOCIAL



MINISTERIO SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL  
REGISTRO GENERAL  
SALIDA  
N. de Registro: 6776 / RG 73277  
Fecha: 16/09/2010 13:16:48

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD  
PÚBLICA Y SANIDAD EXTERIOR

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
SANIDAD EXTERIOR

Vista la solicitud de la Facultad de Medicina, Dpto. de Microbiología, Universidad de Zaragoza con domicilio en la C/ Domingo Miral s/n, 5000 Zaragoza.

**Considerando** que el contenido del paquete es de 4 cajas conteniendo 350 muestras de heces de origen humano tratadas con SAF. Está bien empaquetado y no hay riesgo de derrame. No es corrosivo ni radiactivo. Las muestras serán utilizadas exclusivamente con la finalidad de investigación en biomedicina y que al finalizar la investigación, dicho material será destruido.

Esta Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior,

**RESUELVE:**

Autorizar la entrada en España procedente de Guinea Ecuatorial de las citadas muestras para el fin declarado, comprometiéndose el solicitante a la destrucción, una vez finalizado su uso, de manera segura y conforme a lo dispuesto en la legislación vigente.

De esta Resolución, que se traslada a la persona solicitante, se da también conocimiento a los Servicios Periféricos del Aeropuerto de Vitoria para su aplicación.

Madrid a 16 de Septiembre de 2010

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE SANIDAD EXTERIOR, P.A.  
LA JEFE DE AREA DE CONTROL SANITARIO

Rosemarie Neipp López

SUBDIRECCIÓN GENERAL  
DE SANIDAD EXTERIOR

## Anexo 2. BOE Nº 286. ANEXO II.

	<b>BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO</b>	
Nº 286	Viernes 27 de noviembre de 2009	Sec. I. Pág. 100516

## ANEXO II

**Certificado sanitario para la importación de muestras biológicas y sustancias infecciosas, para fines diagnósticos analíticos y de investigación. Importación ocasional**

Datos del envío:

Naturaleza del envío (si se trata de muestras diagnósticas y/o sustancias infecciosas): .....  
 Muestras diagnósticas .....  
 Descripción del producto: Heces de origen humano .....  
 N.º envases: 4 cajas conteniendo 350m ..... Peso neto 2,7 kg .....  
 N.º UN (1) 2014. Riesgo subsidiario en caso de alteración del envase: Sí No  
 Uso al que va destinado: Investigación biomédica de prevalencia y genotipado de parásitos humanos

Origen del producto:

Nombre y dirección del remitente (persona física o jurídica): .....  
 Laboratorio de análisis clínicos Castroverde, Plaza Mayor s/n Ela  
 Nguema, Malabo.  
 Destino del producto:

El producto se envía

De: Laboratorio Castroverde, Malabo, Guinea Ecuatorial...

A:

Nombre y dirección del expedidor (transportista): DHL Avda Aragón 334 2 Aeropuerto de Barajas, Madr

Medio de transporte (2): aereo .....

Nombre y dirección del destinatario (persona física o jurídica): Dr. A. Clavel, ...

Dpto Microbiología, Facultad Medicina, Universidad de Zaragoza, C/Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza

Certificación:

El abajo firmante, como responsable sanitario, certifica que

1. El envío se corresponde con los datos reseñados en este certificado.
2. El material ha sido acondicionado, conservado, envasado, embalado y etiquetado siguiendo las normas establecidas para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes de diagnóstico de la OMS (WHO/EMC/97.3) Regulaciones de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). Sección 5 Embalajes. Formularios n.º 602 y n.º 650 y Sección 3. 3.6.2. División 6.2 Sustancias infecciosas.
3. La institución/laboratorio remitente cumple con las normas nacionales e internacionales de bioseguridad.
4. En el caso de sustancias infecciosas, la empresa de transporte está autorizada para ello.

Hecho en Malabo a 13 de Septiembre 2010

FIRMA Y SELLO DE LA AUTORIDAD SANITARIA DE ORIGEN

(1) Número internacional de Naciones Unidas que acredita el riesgo humano o animal (2014 humano, 2900 animal).

(2) Deberá cumplir las normas internacionales de transporte en todo caso.

Ministerio de Sanidad y Política Social.  
 Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior.  
 Subdirección General de Sanidad Exterior.  
 Paseo del Prado, 18-20. 28071 Madrid.  
 mbiologicas@msps.es

cve: BOE-A-2009-18902

**Anexo 3. MINSABS. Dirección General de Salud Pública y Planificación Sanitaria.**



**REPÚBLICA DE GUINEA ECUATORIAL  
MINISTERIO DE SANIDAD Y BIENESTAR SOCIAL**

*Dirección General de Salud Pública  
Y Planificación Sanitaria*

Núm. 24-03-150

Ref. ....

Secc. ....  
JAANO

**El Director General de Salud Pública y Planificación Sanitaria  
Dr. Víctor SIMA**

**CERTIFICA**

Que, la Señora Margarita Roka Elobo envía desde Guinea Ecuatorial a Zaragoza, mediante la compañía DHL, muestras tratadas de heces que no son infecciosas ni peligrosas y por lo tanto no revisten ningún riesgo para la salud. Además, dicha muestra será destruida después de realizar un estudio que cuenta con la aprobación de la OMS y el Ministerio de Sanidad de Guinea Ecuatorial.

Malabo, 11 de Marzo de 2010.

**POR UNA GUINEA MEJOR  
EL DIRECTOR GENERAL**



**Anexo 4.** Ficha de variables del estudio.

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:** *“Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial”*

**FICHA DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO.**

**CÓDIGO DEL CENTRO:** \_\_\_\_\_

Código	Edad	Sexo (M/H)	Embarazada (Sí/No)	Diarrea Sí/No	Estreñimiento (Sí/No)	Otros síntomas intestinales	Resultado VIH	TARV Sí/No	Valor CD4+	Nivel formación	Nivel socioeconómico	I. higiénica	Barrio/dirección
<p><b>Diagnóstico microscópico:</b></p> <p><b>Diagnóstico molecular:</b></p> <p><b>Tratamiento parasitario:</b></p> <p><b>Control a los 15 días:</b></p>													

**FECHA:** \_\_/\_\_/\_\_\_\_/

## Anexo 5. Consentimiento informado y firmado. Muestras.

1291

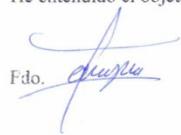
### Consentimiento Informado

La muestra de heces que se recoge servirá para realizar un estudio de parásitos intestinales y analizar la influencia de estos parásitos en la calidad de vida de los pacientes con infección VIH. La información recogida en este estudio es confidencial, y en ningún momento se podrá relacionar los datos recogidos con el participante en el estudio.

Para el análisis copro-parasitológico será necesario recoger de una a tres muestras de heces de cada participante en un contenedor estéril y de un solo uso.

He entendido el objeto del presente estudio y accedo de forma voluntaria a participar.

Fdo.



Fecha

22 / 03 / 2010

**Anexo 6. Consentimiento informado y firmado. Fotos.****Consentimiento Informado**

La fotografía que se recoge servirá para poner de relieve las condiciones ambientales que favorecen la propagación y transmisión de algunas especies de parásitos intestinales. Esta información forma parte del trabajo de investigación que se está llevando a cabo sobre “caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por el VIH/SIDA”.

Las imágenes recogidas en este estudio son confidenciales, y en ningún momento se podrán relacionar en el estudio los datos recogidos con el participante.

He entendido el objeto del presente estudio y accedo de forma voluntaria a participar.

Fdo.

Fecha: 12 / 04 / 2012

**Anexo 7. MINSABS. Dirección General de Coordinación Multisectorial de lucha contra el VIH/SIDA.**



REPUBLICA DE GUINEA ECUATORIAL  
Ministerio de Sanidad y Bienestar Social  
Dirección General de coordinación  
Multisectorial de lucha contra el IH/SIDA

Num. DR-0084-10

Ref. \_\_\_\_\_

Secc. \_\_\_\_\_

**CREDECIAL**

Que se otorga a favor de Dña. **Margarita ROKA ELOBO**, quien se traslada a las UREI'S de Malabo y Bata para la recogida de los datos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral bajo el titulo "Caracterización de los trabajos de parásitos asociados a la infección por VIH/SIDA en Guinea Ecuatorial"

Se ruega a las Autoridades Civiles, Militares y a quienes pudiera dirigirse la presten la ayuda y colaboración que fuese necesaria.

Malabo, 2 de Diciembre de 2009  
POR UNA GUINEA MEJOR  
EL DIRECTOR GENERAL



Anexo 8. MINSABS. Secretario General.



REPUBLICA DE GUINEA ECUATORIAL  
MINISTERIO DE SANIDAD Y BIENESTAR SOCIAL  
-----  
EL SECRETARIO GENERAL

NUM. 09-2323-150  
REF.....  
SECC.....

RIN:  
02/12/09

A la consideracion de la Jefe de Servicio de UREI, Admitir a Doña Margarita Roka para la recogida de datos en tu servicio  
Du. Auce  
3/12/9

Debidamente autorizado por el Titular del Departamento, urge que por esa Dirección Técnica se acuerde las facilidades necesarias a Doña Margarita Roka Elobo, para la recogida de los datos que necesita de la Unidad de Referencia de Enfermedades infecciosas (UREI) del Hospital Regional de Malabo para la realización de los trabajos de su Tesis Doctoral bajo el título "Caracterización de los trabajos de parásitos asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial"

Malabo, 02 de diciembre de 2009  
POR UNA GUINEA MEJOR  
EL SECRETARIO GENERAL,



Señor Director Técnico del Hospital Regional de Malabo.

Anexo 9. MINSABS. Ministro de Estado.



REPUBLICA DE GUINEA ECUATORIAL  
MINISTERIO DE SANIDAD Y BIENESTAR SOCIAL  
=====

**EL MINISTRO DE ESTADO**

10-664-150

Malabo, 25 de marzo de 2010

Señora Doña Margarita ROKA ELOBO,  
Laboratorio Castro Verde,  
Barrio Ela Nguema.

**CIUDAD.-**

Estimada Señora:

De conformidad con su escrito presentado a este Ministerio de Sanidad y Bienestar Social. Solicitando apoyo para la recogida de datos necesarios en la Unidad de Referencia de Enfermedades Infecciosas (UREY) de los Hospitales Regionales de Malabo y Bata, para la realización de los trabajos de su Tesis Doctoral; bajo el título "Caracterización de los Trabajos de Parásitos Asociados a la Infección por VIH en Guinea Ecuatorial".

Este Departamento Ministerial, considerando muy interesante el proyecto, por el beneficiario que puede aportar a los pacientes en general y al pueblo de Guinea Ecuatorial en particular, ha tenido a bien admitir su petición, autorizándola la recogida de datos que solicita.

Atentamente. ↗



POR UNA GUINEA MEJOR  
MINISTRO DE ESTADO,

**Anexo 10. OMS. EQG/MMB/09-566.**



OFICINA DE LA REPRESENTACION DE LA OMS EN GUINEA ECUATORIAL  
Tel.: (240) 09 3234 – 09 4445

In reply please refer: **EQG/MMB/09-566**  
*Prière de rappeler la référence*  
*PM/abc*

Malabo, 29 de Octubre 2009

Estimada Margarita Roka:  
Asunto: **ACUSE RECIBO**

Cortésmente, nos dirigimos a usted acusando recibo de su atenta carta cursada a nuestra Oficina de Representación, en la fecha 27 de Julio 2009.

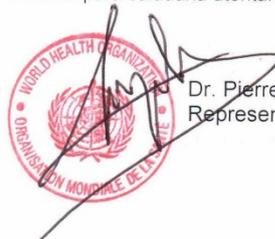
A tal efecto, la transmitimos nuestros atentos y sinceros saludos y ante todo la felicitamos por la iniciativa de llevar a cabo este interesante proyecto que, sin lugar a dudas será en beneficio de los pacientes y del pueblo de Guinea Ecuatorial.

En respuesta a su carta de solicitud de apoyo de la Organización Mundial de la Salud en Guinea Ecuatorial, para la realización de su proyecto de investigación: **Caracterización de los parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial**; ésta Oficina, valora y cree muy importante el desarrollo de un proyecto de tal envergadura, dando una respuesta nacional a la problemática del VIH/SIDA y, permitiendo además integrar al manejo de los pacientes VIH/SIDA, los resultados de su proyecto.

Por todo lo anterior explicado, la Organización Mundial de la Salud en Guinea Ecuatorial, ha validado el protocolo de su proyecto de investigación y, lo apoyará en dos (2) aspectos:

1. Apoyo técnico, a través de la Dra. Angela Katherine Lao Seoane.
2. Apoyo financiero en los viajes de estudios que efectuará a la Ciudad de Bata. Para hacer efectivo este procedimiento, usted debe presentar con una antelación de dos (2) semanas antes de cada viaje a Bata, la ficha técnica, especificando los aspectos importantes del viaje, cronograma y presupuesto.

Sin otro particular, aprovechamos esta oportunidad para saludarla atentamente.



Dr. Pierre Mpele Kilebou  
Representante de la OMS,

Señora Margarita Roka Elobo  
Laboratorio Castro Verde  
**MALABO**

Apartado 330 MALABO. Guinea Ecuatorial. Fax.: (240) 09 3236

Anexo 11. OMS. EQG/MMB/10-679.



Organización  
Mundial de la Salud

OFICINA DE LA REPRESENTACION DE LA OMS EN GUINEA ECUATORIAL  
Tel.: (240) 333 09 3234 – 09 4445

In reply please refer: **EQG/MMB/10-679**  
Prière de rappeler la référence  
ABG/ABC

Malabo, 26 de Octubre 2010

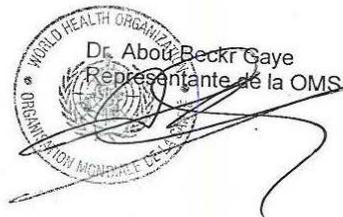
Estimada Margarita:  
Asunto: ACUSE DE RECIBO

Cortésmente, nos dirigimos a usted acusando recibo de su carta recibida en la fecha 30 de septiembre 2010, donde nos relata la situación existente referente al apoyo financiero que la OMS/país le ofreció en su día referencia EQG/MMB/09-566, y que nunca se llevó a cabo.

Lamentamos esta situación, pero la informamos que por razones de disponibilidad de fondos para apoyar su proyecto de: *Caracterización de parásitos intestinales asociados a la infección por VIH en Guinea Ecuatorial*, la oficina no podrá hacer efectiva su compromiso de apoyo financiero en los viajes de estudios en la Ciudad de Bata, como se había comprometido en su día.

Por otra parte, nos es grato comunicarla que ratificamos la validación del protocolo de su proyecto de investigación y el apoyo técnico de parte de la oficina OMS/país, a través de la Dra. Angela Catherine Lao Seoane, como se había establecido, para culminar su importante proyecto.

Sin otro particular, reciba nuestros atentos saludos.

  
Dr. Abou Beckr Gaye  
Representante de la OMS

Señora Margarita ROKA ELOBO, Coordinadora del Laboratorio Castro Verde  
Ela Nguema

**Anexo 12.** Publicación.

Roka M, et al. Prevalence of intestinal parasites in HIV-positive patients on the island of Bioko, Equatorial Guinea: Its relation to sanitary conditions and socioeconomic factors. *Sci Total Environ* (2012), doi:[10.1016/j.scitotenv.2012.06.023](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.023)