

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Asociación de los helmintos transmitidos por el suelo con eosinofilia e hiperinmunoglobulinemia E: Estudio comparativo en escolares de un área rural y un área urbana de Honduras, agosto 2015”

Tesis de grado elaborada por:

CAROL ANAHELKA RODRÍGUEZ TERCERO, MQC

PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA, M.D.C., HONDURAS, C.A.

24 DE SEPTIEMBRE 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTOR

Dr. FRANCISCO HERRERA

VICERECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, MSc

DIRECTOR DE LA DIRECCIÓN DE POSGRADOS

ARMANDO EUCEDA, PhD

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, Lic

COORDINADORA DE LA MAESTRÍA EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES, MSP

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

ANA LOURDES SÁNCHEZ, PhD

TERNA EXAMINADORA

ANA LOURDES SÁNCHEZ, PhD

JOSÉ ANTONIO GABRIE, MSc

CYNTHIA MARILHYN RODRÍGUEZ, MSc

TEGUCIGALPA, M.D.C.

SEPTIEMBRE 2019

HONDURAS, C.A.

Esta tesis está dedicada:

A mis hijos Alejandro y Alessandra, por quienes sigo adelante para enseñarles que cada día se puede ser mejor.

A mis padres Blanca y Yovani, quienes me enseñaron a luchar por mis sueños.

Agradecimientos

Gracias a Dios por darme la sabiduría, la fuerza, el aliento y la paz para culminar esta etapa de mi vida. Nada sería de mi sin su presencia en mi vida.

A mi asesora de tesis, Ana Sánchez por su apoyo constante, su guía y sobre todo por animarme a formar parte de un equipo de trabajo maravilloso donde he podido crecer profesionalmente.

A José Gabrie, María Mercedes Rueda, Joel García, Gabriela Matamoros y Maritza Canales, por su apoyo fundamental en los trabajos de campo. En especial a José Gabrie, por ser parte del análisis de los resultados y el entrenamiento en Brock University, Canadá.

A maestros, padres de familia y escolares de la Escuela Celestino Canales Sierra en Tela y Escuela Villa Olímpica en Tegucigalpa, por abrir sus puertas y permitirnos llevar a cabo este proyecto.

Al laboratorio clínico del Hospital Tela y Escuela de Microbiología, por brindarnos el espacio de trabajo para realizar las actividades de los viajes de campo.

Por último, a mi familia y amigos por apoyarme y motivarme a llegar al final de esta historia.

Contenido

Lista de figuras	viii
Lista de tablas	viii
Lista de anexos	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	xi
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Marco teórico	5
2.1 Biología de los Helmintos Transmitidos por el Suelo	8
2.2 Impacto de los Helmintos Transmitidos por el Suelo en la salud	10
2.3 Respuesta inmune y Helmintos Transmitidos por el Suelo.....	11
2.4 Importancia clínica de la respuesta inmune a los geohelminfos	14
2.5 Relación de los Helmintos Transmitidos por el Suelo con alergia, IgE y eosinofilia	15
2.5.1 Hiper-IgE.....	16
2.5.2 Eosinofilia	18
2.6 Hipótesis de la higiene	20
2.7 Tratamiento antihelmíntico y respuesta inmune	22
Capítulo 3: Metodología.....	23
3.1. Objetivo General	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
3.3. Diseño del estudio.....	23
3.4. Área geográfica del estudio.....	23
3.5. Población de estudio	24
3.6. Tamaño de la muestra.....	24
3.7. Criterios de inclusión y exclusión	24
3.8. Proceso de selección de los participantes en la investigación.....	25
3.9. Recolección de los datos	25
3.11. Recolección de muestras biológicas.....	26
3.12. Análisis de laboratorio.....	27
3.12.1. Examen de heces.....	27
3.12.2. Serología para <i>Strongyloides stercoralis</i>	28

3.12.3. Determinación de IgE total.....	29
3.12.4. Cuantificación de eosinofilia y hemoglobina	29
3.13. Análisis de datos.....	30
3.14. Consideraciones éticas	30
3.15. Aspectos de bioseguridad	31
3.16. Financiamiento.....	31
Capítulo 4: Resultados.....	32
4.1 Características de las poblaciones de estudio.....	32
4.2 Indicadores nutricionales	33
4.3 Parasitismo intestinal	33
4.4. Alergias.....	35
4.5. Diferencias en eosinofilia e hiper-IgE.....	37
4.6. Asociaciones entre eosinofilia e IgE con alergias y geohelminthos	38
Capítulo 5: Discusión	40
Capítulo 6: Conclusiones.....	46
Capítulo 7: Limitaciones, fortalezas del estudio y futuras investigaciones.....	48
Referencias bibliográficas	50

Lista de figuras

Figura 1. Proporción de niños entre 1-14 años que requieren quimioterapia preventiva para HTS, por país, 2009 (WHO, 2012).....	7
Figura 2. Mapeo general de la prevalencia de HTS especie-específica observada en Honduras (Sánchez et al., 2014)	8
Figura 3. Células y moléculas involucradas en la generación de la respuesta inmune en infecciones por helmintos. Tomado de la referencia (19).	13
Figura 4. Inmunoregulación en las infecciones por nematodos y la “Hipótesis de la higiene”. Tomado de (Maizels, 2009).	21
Figura 5. Diferencia en frecuencias de alergias, eosinofilia y concentraciones de IgE entre los grupos de estudio.....	37

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de alérgenos de helmintos y su relación con alérgenos comunes.....	12
Tabla 2. Categorías de infección por geohelmintos*	27
Tabla 3. Características de las poblaciones de estudio.....	34
Tabla 4. Alergias en las poblaciones de estudio de acuerdo con el lugar y la presencia de geohelmintos.	36
Tabla 5. Alergias y geohelmintos de acuerdo con el conteo de eosinófilos y nivel de IgE.	38
Tabla 6. Eosinofilia e hiper IgE en alergias y geohelmintos.....	39

Lista de anexos

Anexo 1. Consentimiento informado	55
Anexo 2. Asentimiento informado	59
Anexo 3. Cuestionario datos generales	62
Anexo 4. Cuestionario síntomas alérgicos	65
Anexo 5. Instrucciones toma de muestra.....	67
Anexo 6. POE toma de muestra sanguínea	68
Anexo 7. POE examen directo de heces	71
Anexo 8. POE Kato-Katz.....	73
Anexo 9. POE Formol-Acetato de Etilo.....	75
Anexo 10. POE determinación de <i>Strongyloides stercoralis</i> IgG.....	77
Anexo 11. POE determinación de IgE	80
Anexo 12. Aprobación CEI-MEIZ.....	84
Anexo 13. Aprobación Brock University.....	85
Anexo 14. Formulario bioseguridad.....	86

Lista de abreviaturas

AAM	Activación alternativa del macrófago
AVADs/DALYs	Años de vida ajustados por discapacidad/ Disability adjusted life years
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay
HPG	Huevo por gramo
HTS	Helminthos transmitidos por el suelo
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
Th	Linfocitos T ayudadores (h=helper)
Treg	Linfocitos T reguladores
TLR	“Toll-like receptors”
WHO/OMS	World Health Organization/ Organización Mundial de la Salud

Resumen

Introducción: Los helmintos transmitidos por el suelo (HTS) son un grupo de parásitos nematodos transmitidos al humano por suelos contaminados con heces humanas conteniendo los estadios infectantes de dichos parásitos. Los HTS de mayor importancia en humanos son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, y los ancilostomatídeos, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*. Las infecciones producidas por estos parásitos son conocidas colectivamente como geohelmintiasis. Las geohelmintiasis crónicas se caracterizan por polarizar el sistema inmune a una respuesta tipo Th2, la cual modula la respuesta inflamatoria. Se especula que la disminución de las infecciones por helmintos está asociada con un incremento en las enfermedades alérgicas. Por el contrario, en zonas carentes de condiciones sanitarias adecuadas donde la transmisión de los HTS es constante, se ha reportado una menor prevalencia de enfermedades de tipo alérgico.

Objetivo: El presente estudio está orientado a establecer la asociación entre las HTS con eosinofilia e hiperinmunoglobulinemia E en escolares de un área rural en comparación con un área urbana de Honduras.

Resultados: El estudio se llevó a cabo durante agosto 2015 a junio 2016 con niños de dos escuelas primarias, una ubicada en un área rural (Tela) y otra en un área urbana del país (Tegucigalpa). Se enlistaron 144 participantes, 71 escolares de Tegucigalpa y 73 de Tela. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el sexo o edad de los dos grupos de estudio. El nivel de parasitismo en los niños rurales fue mucho más elevado que en los niños de la ciudad (47.9% vs. 7%, $p < 0.001$). En Tegucigalpa solamente se encontró *T. trichiura*, mientras que en la aldea de Tela se encontraron todas las especies de HTS. Al analizar por lugar de residencia se encontró que las alergias de la piel y la historia de alergia familiar

fueron más frecuentes en los niños de la ciudad, y que dicha diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.006$ y $p=0.001$, respectivamente). Se observó mayor número de casos de eosinofilia en los niños padeciendo de geohelmintiasis comparados con los menos parasitados. Igualmente, se determinaron concentraciones más altas de IgE tanto en los niños de la aldea como en los parasitados por HTS ($p<0.001$ en ambos casos).

Conclusiones: El presente estudio confirma que las parasitosis intestinales siguen siendo un problema de salud pública en las áreas rurales del país y se confirma de nuevo en Honduras que las geohelmintiasis están fuertemente asociadas a la eosinofilia y las elevadas concentraciones de IgE en niños parasitados. También se demuestra que, en general, las infecciones por HTS podrían ejercer una modulación protectora contra los procesos alérgicos.

Capítulo 1. Introducción

Los helmintos transmitidos por el suelo (HTS) son un grupo de parásitos nematodos transmitidos al humano por suelos contaminados con heces humanas conteniendo los estadios infectantes de dichos parásitos. Los HTS de mayor importancia en humanos son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, y los ancilostomatídeos, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*. *Strongyloides stercoralis* es una quinta especie de geohelminto cuya importancia epidemiológica es menos estudiada y es usualmente excluida de los reportes de la Organización mundial de la Salud (OMS) y de los esfuerzos de control de la mayoría de los países endémicos por HTS. *Ascaris lumbricoides* y *T. trichiura* son más prevalentes en niños mientras que las otras especies tienden a ser más prevalentes en adolescentes (1).

Los HTS revisten mayor importancia clínica en los niños. Las infecciones agudas, sobre todo las primarias o las infecciones masivas, pueden resultar en alta morbilidad. Sin embargo, el impacto en la salud de estas infecciones es causado generalmente por su naturaleza insidiosa y crónica, esto conduce a malnutrición, retrasos en el crecimiento y trastornos en la función cognitiva (2). Además las infecciones alteran el sistema inmune, que mientras protege de daños mayores, desequilibra la respuesta inmune y aumenta la vulnerabilidad hacia otras infecciones (3).

En general, las infecciones helmínticas intestinales son controladas por el hospedero por medio de una respuesta inmune con polarización a los linfocitos tipo 2 (tipo Th2 por sus

siglas en inglés), caracterizada por una amplia gama de células y moléculas como linfocitos B, reclutamiento y maduración de basófilos, eosinófilos y mastocitos, inmunoglobulinas (Ig), mucinas, e interleucinas (IL). En el humano, las inmunoglobulinas circulantes más prominentes son la IgG, especialmente IgG4 y la IgE. Entre las interleucinas, la producción elevada se observa más notablemente en IL-4, IL-5 e IL-13 (3, 4). La reacción inicial es fuertemente inflamatoria, pero a medida que la cronicidad aumenta, se inicia una respuesta reguladora destinada a proteger el hospedero de daños ulteriores. Este tipo de respuesta se denomina Th2 modulada, pues es mediada por linfocitos T reguladores y la expresión aumentada de IL-10, una interleucina con potente actividad antiinflamatoria (3). El estado antiinflamatorio causado por la IL-10 paradójicamente aumenta la susceptibilidad a nuevas infecciones por HTS (5). Por otro lado, la reducción sistémica y a largo plazo de procesos antiinflamatorios ha sido asociada como factor protector para ciertas condiciones autoinmunes, por ejemplo la colitis, artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y la diabetes tipo 2, entre otras (6-9). Además, muchos estudios han demostrado que las infecciones por HTS pueden tener un efecto protector contra las alergias y el asma (10).

El aumento global de las alergias en las áreas urbanas ha llevado a muchos investigadores a proponer una modificación de la “hipótesis de higiene”, en la cual se dice que la disminución de las infecciones por helmintos está asociada con un incremento en las enfermedades alérgicas (8). En América Latina, la urbanización, migración y desarrollo económico han resultado en mejoras en el acceso a agua potable, acueductos, medidas sanitarias y otras medidas de higiene. Según algunos autores la disminución de las enfermedades infecciosas incluyendo las geohelmintiasis en la infancia, podría explicar el aumento en la prevalencia

de las enfermedades alérgicas en las áreas industrializadas (11). Por el contrario, en zonas carentes de condiciones sanitarias adecuadas donde la transmisión de los HTS es constante, se ha reportado una menor prevalencia de enfermedades de tipo alérgico, posiblemente por la modulación mediada por estos parásitos (12, 13). Se postula que, debido a las campañas de desparasitación masiva destinadas a reducir la prevalencia de los HTS en países endémicos, se podría dar un incremento de alergias entre la población (14, 15).

En Honduras, al igual que todos los países endémicos por HTS, por recomendación de la OMS se ejecutan campañas de desparasitación una o dos veces al año (16). Estos esfuerzos, sin duda han disminuido la prevalencia de geohelmintiasis en algunas zonas del país. Sin embargo, en lugares donde las condiciones sanitarias continúan siendo precarias, las reinfecciones ocurren rápidamente y es posible que la prevalencia regrese a niveles iniciales en menos de 6 meses, tal como se ha demostrado en países similares (17). El ciclo parasitismo-desparasitación-reinfección que padecen los niños viviendo en lugares endémicos sin duda alguna altera su respuesta inmunitaria tanto contra los parásitos intestinales, como hacia otras infecciones y procesos alérgicos. En Honduras se han realizado dos estudios documentando el tipo de respuesta inmunológica que presentan los niños durante el ciclo natural de infección, aunque estos no se han relacionado con los cambios en la expresión inmunológica a consecuencia de los tratamientos desparasitantes y la consiguiente reinfección. El primer estudio, realizado por Sánchez y colaboradores demostró una relación proporcionalmente significativa entre la presencia de geohelmintiasis y el poliparasitismo con niveles circulantes de IL-10 (4). Sin embargo, éste fue un estudio transversal, sin información clínica ni ambiental y con participantes de una sola población

rural. El segundo estudio, realizado por Gabriele y colaboradores demuestra la polarización a la respuesta Th2, con niveles elevados de ILs, eosinofilia e hiper IgE (18). Este estudio revela información importante sobre el funcionamiento del sistema inmune, pero al igual que el anterior se realizó únicamente en una población rural. Tampoco se han hecho estudios explorando si en Honduras se cumple la hipótesis de que a menor prevalencia de parásitos intestinales mayor probabilidad de procesos alérgicos entre la población.

Por estas razones, el presente estudio tiene por objetivo documentar el perfil de eosinofilia y de IgE en dos poblaciones de escolares con diferentes condiciones epidemiológicas: una rural al norte del país y otra urbana en la capital de Honduras. En ambas poblaciones se investigó las infecciones por HTS, se midieron niveles circulantes de IgE y se evaluó la presencia de eosinofilia; también se recolectó información demográfica y epidemiológica, y se determinó la presencia de procesos alérgicos entre los participantes.

Capítulo 2. Marco teórico

Helminto es un término usado para agrupar parásitos ecológicamente similares que se dividen en tres phyla de importancia médica: Platyhelminthes, Nematoda y Acanthocephala (19). En el grupo de los nematodos, se encuentran los helmintos transmitidos por el suelo (HTS), término que se refiere a un grupo de gusanos cilíndricos que son transmitidos a los humanos por suelos contaminados con heces que contienen estadios infectantes de estos parásitos. Debido a dicho mecanismo de transmisión, las infecciones causadas por estos helmintos son conocidas como geohelmintiasis. Los HTS de mayor importancia para los humanos son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*. Otro HTS de importancia es *Strongyloides stercoralis*, aunque no es reportado con frecuencia (1).

Los últimos datos obtenidos por la OMS indican que más de dos mil millones de personas están infectadas con estos parásitos (1). Se estima que el número de personas infectadas con *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y ancilostomatídeos asciende a 1,221 millones, 795 millones, y 740 millones, respectivamente (20). En cuanto a la carga de enfermedad, las geohelmintiasis causan la pérdida de 5.18 millones de DALYs (disability-adjusted life years) o AVADs, por sus siglas en español (años de vida ajustados por discapacidad); es decir años de vida saludable perdidos por muerte prematura o discapacidad (21). La carga de la enfermedad por HTS es atribuida en su mayoría al impacto de su cronicidad en la salud y la calidad de vida de los infectados más que a la mortalidad que puedan causar. Esto produce ausentismo

escolar, reducción de la productividad en los adultos y resultados adversos en el embarazo (1).

Las geohelmintiasis son de mayor prevalencia en poblaciones pobres que viven en climas húmedos tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo, donde las medidas sanitarias son inadecuadas. Estas infecciones generalmente son adquiridas después de los nueve meses de edad, cuando el niño empieza a exponerse a suelos contaminados, y pueden persistir hasta la edad adulta debido a la exposición constante (22). Estos parásitos pueden afectar el estado nutricional de sus hospederos debido a que se alimentan del contenido intestinal o tejidos de este, causando problemas de digestión y absorción de nutrientes, y desencadenan una respuesta inflamatoria que lleva a una producción de sustancias que afectan el apetito, consumo, metabolismo y almacenamiento de micronutrientes, y una respuesta inmune que incrementa el consumo de energía (23).

Las exposiciones intensas de poblaciones enteras a estas infecciones precisan de intervenciones gubernamentales destinadas a disminuir la morbilidad. Bajo la recomendación de la OMS, los países endémicos se han propuesto enfrentar el problema mediante la administración masiva de desparasitaciones a grupos específicos de la población (más comúnmente niños menores de 14 años). En el ámbito de la OMS, la desparasitación masiva es denominada “quimioterapia preventiva” (o “farmacoterapia preventiva”) (los desparasitantes no previenen la infección, sino que probablemente previenen la morbilidad).

Honduras es considerado un país endémico en el cual más de dos tercios de los niños menores de 14 años requieren desparasitación frecuente (Figura 1).

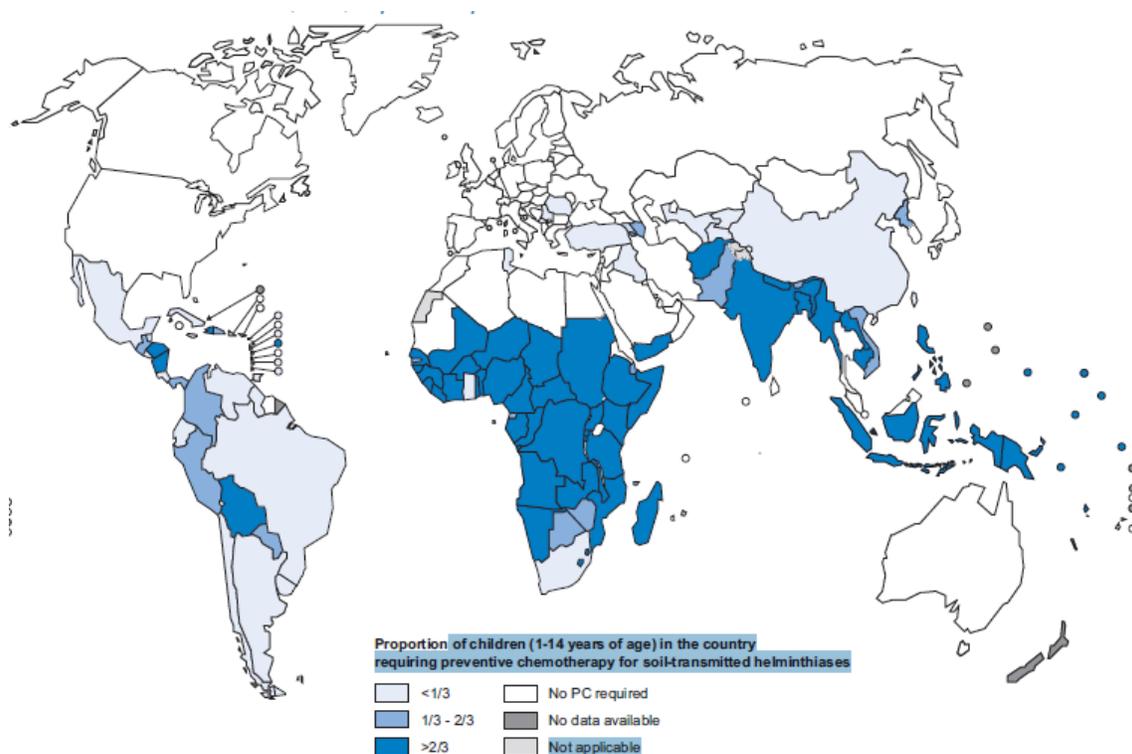


Figura 1. Proporción de niños entre 1-14 años que requieren quimioterapia preventiva para HTS, por país, 2009. Tomado de referencia (1).

En cuanto a Honduras, específicamente, un estudio realizado por Sánchez y colaboradores donde se recolectó toda la información publicada sobre prevalencias de HTS para el período entre 2001-2010 en diferentes áreas del país, demuestra que hay zonas donde la prevalencia es mayor al 50%, siendo estas zonas rurales del país donde existen condiciones de pobreza que favorecen la persistencia de estos parásitos (Figura 2).

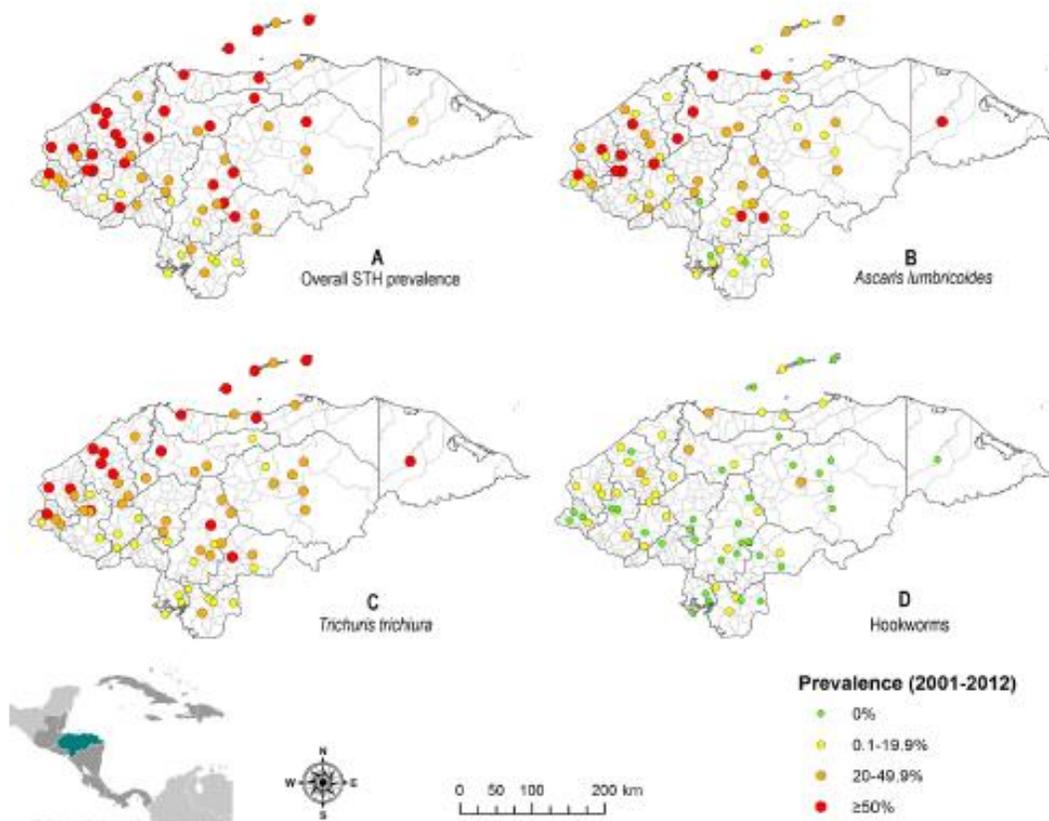


Figura 2. Mapeo general de la prevalencia de HTS especie-específica observada en Honduras.

2.1 Biología de los Helmintos Transmitidos por el Suelo

Los HTS deben su nombre al hecho de que los huevos, una vez expulsados en las heces de los individuos infectados, requieren un período de maduración en el suelo antes de volverse infectantes. Debido a la defecación al aire libre común de comunidades endémicas, la contaminación constante del ambiente permite que la transmisión se perpetúe y que después de las desparasitaciones masivas, la comunidad se reinfecte rápidamente. Esta infección se adquiere por la ingestión de los huevos (*A. lumbricoides* y *T. trichiura*) o por penetración cutánea de larvas (ancilostomatídeos) (23).

Después de la ingestión, los huevos de *A. lumbricoides* se rompen y las larvas se liberan en el intestino delgado desde donde migran a través de la circulación hasta llegar a los pulmones donde permanecen de 7 a 10 días para mudar. En este momento se genera una respuesta de tipo celular que ocasiona los síntomas que se conocen como síndrome de Löeffler. Las larvas ascienden a los bronquios hasta ser deglutidas; regresan al intestino delgado, donde maduran hasta adultos, donde se genera una respuesta a nivel intestinal que involucra la liberación de diferentes interleucinas y producción de IgE. El período prepatente es aproximadamente de 8-10 semanas (19, 23).

En el caso de *T. trichiura* los huevos embrionados son deglutidos y las larvas se liberan en el intestino, pero al contrario que *A. lumbricoides*, las larvas no realizan migración, sino que viajan hasta el intestino grueso donde llegarán a su hábitat definitivo en el colon. Las larvas invaden la mucosa intestinal donde se desarrollan en adulto. El adulto vive parcialmente enhebrado en la pared del colon con su porción anterior; mientras que la porción posterior permanece libre en el lumen. El periodo prepatente de *T. trichiura* es entre 8-12 semanas. (23).

En el caso de los ancilostomatídeos, las larvas infectantes permanecen en el suelo hasta entrar en contacto directo con la piel del hospedero, las cuales penetran con ayuda de enzimas líticas como la colagenasa. Una vez localizado un capilar, las larvas entran en la circulación hasta llegar a los pulmones realizando un ciclo similar al de *A. lumbricoides*; después son deglutidas y llegan al intestino delgado donde maduran hasta adultos. El ciclo de vida de

estos HTS genera una respuesta inmune diversa, desde la penetración de la larva (a nivel dérmico), su paso por los pulmones y la presencia de los adultos en el intestino. El período prepatente es de 4-7 semanas (23-25).

2.2 Impacto de los Helminthos Transmitidos por el Suelo en la salud

Como se mencionó anteriormente, las geohelmintiasis están asociadas con morbilidad y mortalidad en los niños. Las manifestaciones clínicas están asociadas con la intensidad de la infección, pero aun infecciones crónicas de baja intensidad pueden ocasionar anemia, retardo del crecimiento y daño cognitivo (22). La morbilidad de la infección depende de la especie de helminto y de si la infección es causada por una sola especie o por múltiples especies.

Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la morbilidad de las geohelmintiasis incluyen: alimentación del contenido intestinal y tejidos como sangre, células y secreciones del hospedero, causan problemas de digestión o absorción de nutrientes como resultado del daño físico al epitelio intestinal, provocan una respuesta de tipo inflamatoria con producción de moléculas que afectan el apetito, metabolismo y almacenamiento de nutrientes, además esta respuesta representa un consumo de energía que podría invertirse en procesos de crecimiento, y además; alteración de la microbiota del intestino la cual a su vez interfiere en procesos inmunes y metabólicos (23, 26).

2.3 Respuesta inmune y Helminos Transmitidos por el Suelo

Las geohelmintiasis inducen una respuesta inmune tipo Th2. Dicha respuesta es efectiva contra patógenos demasiado grandes como para ser eliminados por fagocitosis o activación de complemento, ya que tienen la capacidad de evadir estas respuestas (26). Caraballo y colaboradores plantean la hipótesis de que la actual relación de parasitismo entre helmintos y humanos se estableció porque los helmintos se adaptaron a convivir con aquellos hospederos que fueran más vulnerables ante sus mecanismos inmunosupresores y, además, tuvieran una respuesta inmunitaria lo suficientemente apropiada para no eliminarlos (27). En cambio, infecciones intracelulares por virus, bacterias, protozoos y algunos hongos desarrollan una respuesta de tipo Th1 para ser combatidas. Esta es una respuesta inflamatoria mediada por la producción de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12 (7, 18, 28).

Al igual que las infecciones por helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomatídeos, *Strongyloides stercoralis*, *Toxocara*, *Schistosoma* y las filarias, los procesos alérgicos por presencia de ácaros, polen y cucarachas entre otros inducen una respuesta Th2, esto se explica debido a la presencia de alérgenos similares presentes en estos parásitos tal como lo describe la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de alérgenos de helmintos y su relación con alérgenos comunes.

Alérgeno del helminto	Nombre común	Alérgeno común relacionado	Referencias
<i>Ascaris lumbricoides</i>			
Asc l 3	Tropomiosina	Bla g 5 (cucarachas)	(29) (30)
Asc s 1	ABA-1	Pen ch 31 (hongos)	(31)
<i>GSTA</i>	Glutation-S-transferasa 1	Der p 8 (ácaros del polvo)	(12)
<i>Necator americanus</i>			
Nec a ASP-2	ASP-2	Desconocido	(31)
Nec a calreticulín	Calreticulina	Desconocido	(12)
<i>Echinococcus granulosus</i>			
Hsp70	Hsp70	Der f HSP70 (ácaros del polvo)	(12)
<i>Schistosoma mansoni</i>			
Sch j PM	Paramiosina	Der f 11 (ácaros del polvo)	(12)

De acuerdo con Jackson y colaboradores, la iniciación de la respuesta Th2 puede deberse a una interacción entre un PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) que proviene del gusano y un receptor (probablemente de la familia de los “*toll-like receptors*” o TLRs) en las células dendríticas que reconocen este patrón. Toda esta interacción es dirigida por una serie de citoquinas que incluyen interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21, IL-25 y la IL-

mismo tiempo beneficia al hospedero porque evita una inflamación excesiva que puede causar patología. Esto es lo que se conoce como inmunomodulación del sistema inmune por parte de los HTS (27, 33).

Los mecanismos por los cuales las geohelmintiasis crónicas modulan la inmunidad en la mucosa no se conocen perfectamente todavía, pero se han utilizado modelos animales donde se suprime la respuesta de las células dendríticas a la respuesta TLR y la capacidad de producir IL-12. Esto resulta en un ambiente predominantemente de tipo Th2 que promueve el desarrollo de la activación alternativa de los macrófagos (AAM) y células inmunes productoras de IL-10, que tiene la capacidad de disminuir la respuesta inflamatoria (22).

2.4 Importancia clínica de la respuesta inmune a los geohelminintos

El momento de la primera exposición a los parásitos es también importante, dependiendo del momento ya sea prenatal o postnatal, la carga de gusanos y la exposición a otros factores ambientales (tales como ambientes ricos en microorganismos o una nutrición alterada), que pueden determinar la programación de la respuesta inmune que el niño desarrollará en su vida (33).

Las infecciones en niños e incluso las infecciones maternas pueden tener efectos a largo plazo en la inmunidad de los infantes que pueden incluir la supresión de respuestas alérgicas a alérgenos no parasíticos, y estos efectos pueden ser no reversibles al recibir el tratamiento antihelmíntico en la edad escolar (22).

En un estudio prospectivo realizado en Brasil por Figueiredo y colaboradores, se demostró que los niños que presentan infecciones crónicas con HTS están asociados a la supresión de la producción de citoquinas relacionadas con la respuesta a mitógenos con una producción espontánea de IL-10. Esta regulación puede contribuir al desarrollo de un fenotipo antiinflamatorio que puede mediar la modulación de alergia que ha sido atribuido a estas infecciones. Otros estudios realizados en escolares han examinado el efecto de las geohelminCIAS y las respuestas a alérgenos mediante pruebas de punción cutánea. La mayoría de estos estudios muestran una baja reacción a las pruebas cutáneas en niños que están infectados con HTS, esto sucede porque la respuesta policlonal de la IgE se dirige hacia los parásitos (10, 33, 34).

2.5 Relación de los HelminTos Transmitidos por el Suelo con alergia, IgE y eosinofilia

Como se mencionó anteriormente, los HTS, así como los procesos alérgicos, presentan una respuesta de tipo Th2 que se caracteriza principalmente por la producción de IL-4, IL-5, IL-13, presencia de IgE y eosinofilia. Se ha visto que en áreas donde la carga parasitaria es baja, la frecuencia de dermatitis atópica, hipersensibilidad alérgica y dificultades respiratorias es alta (26, 35).

Se especula que en países endémicos, las infecciones crónicas de intensidad moderada o severa protege a los niños contra las alergias; mientras que la exposición esporádica, en edades más tardías y con infecciones intermitentes potencian las alergias en niños sensibilizados a través de una estimulación de tipo Th2 (36).

Como se explicó antes, las infecciones crónicas inducen una fuerte respuesta de Tregs y estas combinadas con la supresión de mastocitos, basófilos y eosinófilos parecen ser el mayor componente de la respuesta inmune en contra de los aero-alérgenos. Por eso, la constante exposición a edades tempranas puede proveer protección contra el desarrollo de atopia y enfermedades alérgicas. Sin embargo, la supresión alérgica en estos individuos es un equilibrio dinámico pero frágil que puede romperse y ocasionar inmunopatologías graves en el hospedero (11, 34).

2.5.1 Hiper-IgE

Como se mencionó anteriormente, las geohelmintiasis se caracterizan por una producción incrementada de IgE. Al mismo tiempo, dicha inmunoglobulina está fuertemente asociada a procesos alérgicos. Alergia, se define como una reacción de hipersensibilidad mediada por mecanismos inmunológicos, los cuales pueden ser mediados por anticuerpos o por células. En la mayoría de los casos, el anticuerpo responsable por las reacciones alérgicas es IgE, por ejemplo el asma (37).

La IgE es la molécula que define la especificidad de la respuesta inmune y tiene características estructurales que determinan las particularidades de la activación celular que desencadena. Su producción está fuertemente regulada y aun en individuos con niveles elevados, estos permanecen por varios órdenes (ng/ml) menores que otros anticuerpos, como la IgG (mg/ml). Los trastornos de esta inmunoglobulina son más por aumento que por deficiencias en su producción (27).

Atopia es el término utilizado para definir el aumento de los niveles de IgE en respuesta a bajas dosis de alérgenos, usualmente de origen proteico, y que tiene como consecuencia la tendencia de desarrollar síntomas de asma, rino-conjuntivitis, o alteraciones dérmicas como el eczema.

La interacción de alérgenos del ambiente con el sistema inmune incluye células presentadoras de antígenos y estimulación de células T, que lleva a la producción de citoquinas de tipo Th2. Estas citocinas estimulan la producción de IgE y aumento en el número de eosinófilos y mastocitos (34). Su producción está bajo el control de la interleucina 4 (IL-4) y la IL-13. Los linfocitos Th2, que probablemente son anteriores a la IgE, son la fuente más importante de estas citocinas. Aunque hay células de la inmunidad innata que producen IL-4 e IL-13, los linfocitos son necesarios para la producción de IgE, pues a través de señales por contacto intercelular (CD40/CD40L) inducen el cambio de isotipo en los linfocitos B hacia la cadena pesada épsilon (38).

Los niveles circulantes de IgE son un buen indicador de la tendencia a procesos alérgicos. Los valores de referencia normales son hasta 100 U/mL. Se define como hiperinmunoglobulinemia E cuando la concentración de IgE en sangre periférica es mayor a 100 U/mL. La hiperinmunoglobulinemia E se clasifica como leve (≥ 100 –399 U/mL), moderada (≥ 399 –999 U/mL) o severa (≥ 1000 U/mL) (39, 40).

Cerca de 30 % de los humanos normales tienen una respuesta Th2/IgE contra algún alérgeno. Además, la mayoría de los humanos presentan esta misma respuesta contra los helmintos (27, 41).

Los niveles totales de IgE en poblaciones de países industrializados se ven afectados por la edad, factores genéticos, étnicos y socioeconómicos. Las causas de los altos niveles de IgE en países tropicales de bajo o mediano ingreso no están bien caracterizadas, pero se atribuyen también a factores genéticos y a las altas exposiciones a los helmintos intestinales, ya que cubren el helminto para facilitar la unión de mastocitos y eosinófilos por medio de sus receptores (42, 43).

Muchos estudios en inmigrantes a países de alto ingreso reportan niveles altos de IgE, que son más elevados que los presentados por la población local. La mayoría de estas hiperinmunoglobulinemias se han asociado a la presencia de parásitos (39). A pesar de ser poblaciones con altos niveles de IgE no presentan reacciones de tipo alérgico, y una vez que reciben el tratamiento antiparasitario los niveles disminuyen considerablemente (44).

2.5.2 Eosinofilia

Los eosinófilos son leucocitos polimorfonucleares producidos en la médula ósea, que actúan en la inmunidad contra parásitos y en algunas enfermedades, principalmente de tipo alérgico.

Sus gránulos tienen una alta especificidad contra algunos virus respiratorios, hongos e infecciones parasitarias (27, 45, 46).

Es conocido que los eosinófilos responden claramente a las señales de otros leucocitos, sobre todo a citocinas de las células Th2, específicamente IL-5 aunque también pueden tener vías alternativas de activación por medio de otros receptores o interleucinas como IL-33, y estos liberan otras citocinas (IL-6, IL-10, IL-13), quimiocinas (CCL3, CCL5, CCL7) y proteínas granulares (peroxidasa eosinofílica, MBP) que promueven la regulación inmune y tienen un impacto en la función de otros leucocitos (45, 47, 48).

Se han descrito tres funciones fundamentales de los eosinófilos que pueden contribuir a la inducción de la inmunidad Th2 por medio del reclutamiento celular a diferentes tejidos: (1) los eosinófilos proveen fuentes de inducción de citocinas tempranas en los tejidos y nódulos linfáticos; (2) procesan y presentan antígenos directamente a células T CD4+ vírgenes, promoviendo la diferenciación y expansión clonal de Th2; y (3) excretan quimio-atrayentes que reclutan células Th2 efectoras a los tejidos inflamados (49).

El límite superior normal para el rango de porcentaje de eosinófilos en sangre periférica es 3%–5%, con un conteo absoluto de 350–500/ μ L. La eosinofilia se define como un incremento en sangre periférica cuando presenta un conteo absoluto mayor a 500 eosinófilos/ μ L de sangre y la severidad se ha definido de manera arbitraria como leve entre 500-1500/ μ L,

moderada entre 1500-5000/ μ L y severa $>5000/\mu$ L (50, 51). La eosinofilia es detectable generalmente en el período prepatente del parasitismo. Su función es destruir algunos estadios parasitarios mediante citotoxicidad (39, 50, 52).

Se ha observado una asociación directamente proporcional entre la intensidad de la infección por helmintos y eosinofilia en sangre periférica, IgE total elevada, producción espontánea de IL-10 y producción de citocinas de tipo Th2 (10). En estudios realizados en poblaciones migrantes con altos grados de parasitismo, este valor se ve aumentado, unido a la elevación de IgE; por lo que ambos pueden considerarse marcadores biológicos de las infecciones por helmintos (39).

2.6 Hipótesis de la higiene

La hipótesis de la higiene trata de explicar el actual incremento en la prevalencia de enfermedades alérgicas en países industrializados por la falta de estímulo antigénico suficiente (por las mejoras en higiene, acceso a antibióticos, vacunas, etc.). De acuerdo con sus proponentes, esta situación conduce al desbalance Th1/Th2 que resulta en una respuesta exagerada del hospedero a todo tipo de alérgenos inocuos lo cual eventualmente desencadena condiciones de tipo alérgico (34).

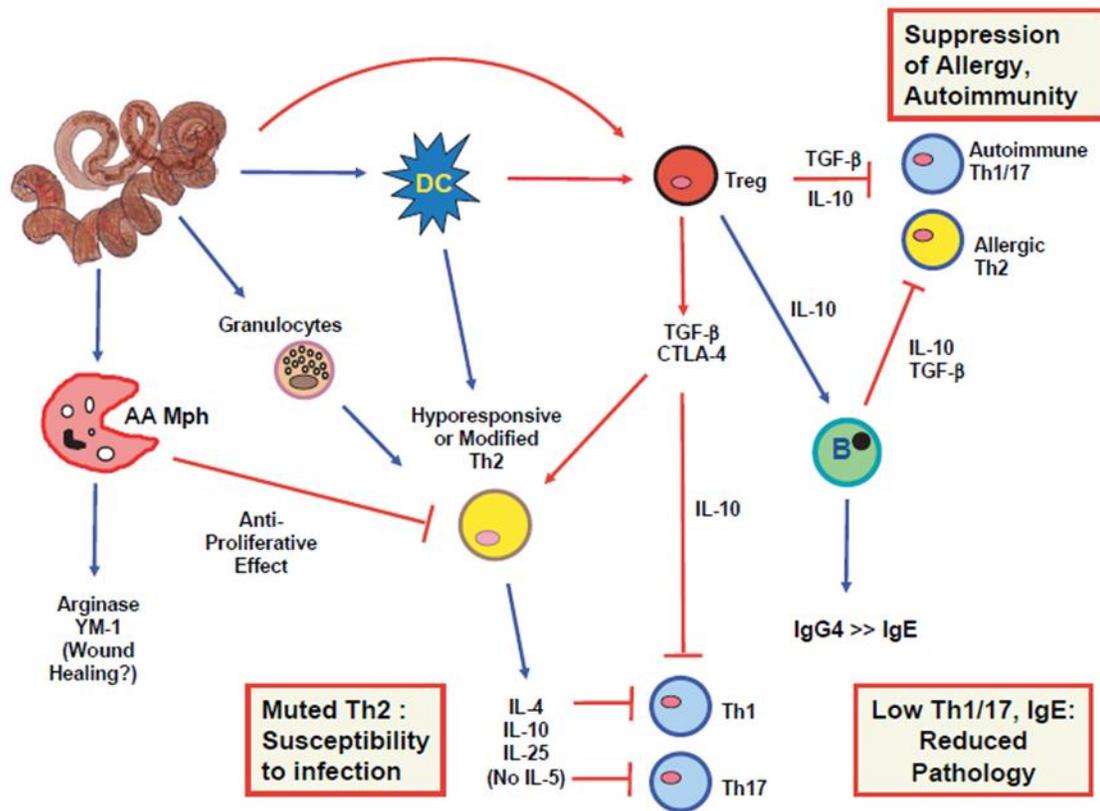


Figura 4. Inmunoregulación en las infecciones por nematodos y la “Hipótesis de la higiene”. Tomado de referencia (8).

Por tanto, esta hipótesis atribuye el incremento de alergias al fallo de la inmunoregulación resultante de la exposición disminuida a ciertos agentes biológicos que han coexistido con sus hospederos mamíferos a través de la historia evolutiva (34).

Una modificación más reciente de la hipótesis va aún más lejos al proponer que en los países industrializados, la incidencia de alergias y enfermedades inflamatorias autoinmunes crónicas ha aumentado debido a la disminución de las infecciones por helmintos. Esto se cree es debido a la ausencia de la inmunosupresión ejercida por los parásitos (26, 27).

América Latina está en rápido crecimiento, incluyendo urbanización, migración, desarrollo económico y adopción de nuevos estilos de vida. Este esfuerzo por mejorar las condiciones de higiene podría afectar el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune en el humano. Una disminución de la exposición a agentes infecciosos, incluidos los HTS en los niños podría resultar en el incremento de la prevalencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes (13).

2.7 Tratamiento antihelmíntico y respuesta inmune

Diferentes estudios demuestran que una o varias dosis de drogas antihelmínticas tienen efectos en la respuesta a los antígenos parasitarios, sobre todo en la producción de citocinas. También, se ha demostrado que las personas expuestas a largos tratamientos antihelmínticos pueden incrementar su reactividad a las pruebas de punción cutánea para diferentes aeroalérgenos (15).

Las consecuencias de la desparasitación deben ser estudiadas y monitoreadas en el campo, ya que pueden ocasionar cambios en la regulación de sistema inmune que pueden llegar a ser irreversibles (19).

Capítulo 3: Metodología

3.1. Objetivo General

Establecer la asociación entre las infecciones por helmintos transmitidos por el suelo con eosinofilia e hiperinmunoglobulinemia E en escolares de un área rural en comparación con un área urbana de Honduras durante agosto 2015 a junio 2016.

3.2. Objetivos específicos

1. Establecer la prevalencia e intensidad de las infecciones por helmintos transmitidos por el suelo en ambas poblaciones de estudio.
2. Establecer la prevalencia de eosinofilia e hiper IgE total circulante en ambas poblaciones de estudio.
3. Determinar asociación estadística entre las infecciones por HTS y la eosinofilia e hiper IgE en ambas poblaciones.

3.3. Diseño del estudio

Este estudio es de tipo observacional con un diseño analítico transversal, no experimental.

3.4. Área geográfica del estudio

El estudio se llevó a cabo en dos escuelas primarias, una ubicada en un área rural y otra en un área urbana del país. En el área rural, la aldea Santa Cruz del Junco del municipio de Tela en el departamento de Atlántida, ubicado en la zona norte de Honduras. En el área urbana, la

ciudad capital de Honduras, Tegucigalpa en el departamento de Francisco Morazán, ubicada en la zona centro de Honduras.

3.5. Población de estudio

Se seleccionaron dos diferentes poblaciones de estudio:

1. La población escolar que asiste a la Escuela Rural Mixta Celestino Canales Sierra ubicada en la aldea Santa Cruz del Junco del municipio de Tela.
2. La población escolar que asiste a la Escuela Urbana Mixta Villa Olímpica ubicada en la ciudad de Tegucigalpa del municipio del Distrito Central.

3.6. Tamaño de la muestra

La muestra del estudio se seleccionó por conveniencia intencional, basado en el presupuesto disponible. Se enlistaron una total de 144 participantes en la investigación, 73 del área rural y 71 del área urbana.

3.7. Criterios de inclusión y exclusión

1. Criterio de inclusión: se incluyeron los escolares de primero a sexto grado matriculados en la escuela rural “Celestino Canales Sierra” y escolares de segundo a quinto grado matriculados en la jornada diurna de la escuela urbana “Villa Olímpica”.
2. Criterio de exclusión: no hubo criterios de exclusión de ningún tipo.

3.8. Proceso de selección de los participantes en la investigación

Se invitó una escuela de un área rural de la zona norte del país ya que en esta región presentan prevalencia elevadas de helmintos transmitidos por el suelo y tienen las condiciones ambientales y epidemiológicas para la transmisión constante de los parásitos, y una escuela de la zona centro del país, específicamente la capital donde se presentan prevalencias bajas de los parásitos.

Se visitaron las escuelas escogidas para dar a conocer el estudio, los directores aceptaron participar y se les entregó una carta de invitación para formalizar la participación de la escuela. Una vez formalizada la participación de las escuelas se reunieron los padres de familia para socializar el estudio. Se leyó y explicó el consentimiento informado (Anexo 1), el cual firmaron en presencia de un testigo, una vez que aceptaban la participación de su hijo/a en el estudio. Una vez que el padre o tutor aceptó que su hijo/a participara, se reunió a los participantes para leerles y explicarles el asentimiento informado (Anexo 2); luego se les preguntó individualmente si deseaban participar en el estudio.

Los niños/as que tenían el consentimiento informado de su padre o tutor y asentimiento informado formaron parte del estudio.

3.9. Recolección de los datos

Se utilizaron cuestionarios estandarizados, para recabar dos tipos de datos:

1. Cuestionario con datos demográficos y epidemiológicos: es una entrevista individual con el participante incluyendo edad, sexo, historia de parasitismo y desparasitación, conocimiento sobre los parásitos, y condiciones de la vivienda —tipo de suelo, disposición de excretas, tipo de agua de consumo— (Anexo 3).

2. Presencia de síntomas alérgicos: es una entrevista individual con el padre o tutor incluyendo preguntas relacionadas con las diferentes presentaciones alérgicas (rinitis, asma, eczema, gastrointestinal), la exposición a alérgenos (polvo, humo, pelos de animales, medicamentos) y factores hereditarios (familiares con procesos alérgicos) (Anexo 4).

3.11. Recolección de muestras biológicas

Se recolectaron dos tipos de muestra:

1. Muestra de heces: se hizo entrega a los padres o tutores de los materiales necesarios para recolección de muestra a los participantes, incluyendo: una bacinica, guantes de vinilo, paleta de madera (baja lenguas), bolsa transparente, bolsa de manila, frasco plástico de boca ancha, limpio, transparente con tapadera de rosca y una hoja de instrucciones con imágenes para la recolección de la muestra (Anexo 5). Esta entrega se hizo dos días antes de la obtención de la muestra sanguínea. El niño llevó la muestra a la escuela el día que se les hizo la entrevista y la toma de la muestra sanguínea.
2. Muestra de sangre: se obtuvo por venopunción de la vena basílica o cefálica del antebrazo utilizando para esto el sistema al vacío Vacutainer™. Se recolectaron dos tubos de sangre venosa (Anexo 6), uno con anticoagulante K2-EDTA para determinar el número de eosinófilos y hemoglobina; y otro, sin anticoagulante para obtener suero y determinar los valores de IgE.

3.12. Análisis de laboratorio

3.12.1. Examen de heces

De esta muestra se realizaron tres tipos de análisis:

1. Examen directo: este método es utilizado en la rutina del laboratorio clínico (Anexo 7). Tiene como propósito la identificación de huevos y larvas de helmintos en un montaje de solución salina y la búsqueda y diferenciación de quistes y trofozoítos de protozoos en un montaje con solución de lugol. Tiene la ventaja de ser un método sencillo, rápido y de bajo costo y la solución salina permite observar formas móviles de parásitos en caso de estar presentes. Su desventaja es que utiliza poca muestra (2 mg), lo que hace que sea un método con baja sensibilidad (53).
2. Examen microscópico por la técnica de Kato-Katz: es un método de concentración que utiliza una plantilla estandarizada para obtener 41.7 mg de muestra (Anexo 8). El método es tanto para la detección de huevos de HTS como para la estimación de la intensidad de infección (53). El resultado se expresa en número de huevos de helminto por gramo (HPG) de heces, y por intensidad de infección leve, moderada o severa (1), de acuerdo al número de HPG de heces, según demuestra la tabla 2.

Tabla 2. Categorías de infección por geohelmintos*

Geohelminto	Infección leve	Infección moderada	Infección severa
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 – 4,999 HPG	5,000–49,999 HPG	>50,000 HPG
<i>Trichuris trichiura</i>	1 – 999 HPG	1,000 – 9,999 HPG	>10,000 HPG
Ancilostomatídeos	1 – 1,999 HPG	2,000 – 3,999 HPG	>4,000 HPG

*(1)

3. Método de Ritchie o Formol-acetato de etilo: este es un método de concentración por sedimentación que se utiliza para recobrar huevos y larvas de helmintos, así como ooquistes y quistes de protozoos (53). En este estudio, este método se utilizó como complemento del estudio parasitológico de protozoos que no se lograron observar en el examen directo. Se preservaron 2 g de heces en 6 mL de formalina al 10% en un tubo cónico para su posterior procesamiento en la UNAH (Anexo 9).

3.12.2. Serología para *Strongyloides stercoralis*

Debido a que el examen parasitológico es poco sensible para detectar *Strongyloides stercoralis*, a menos que se utilice el método de Baermann o cultivos en agar (54), se realizó un estudio serológico para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra dicho parásito. Se obtuvo suero a partir de la muestra de sangre venosa sin anticoagulante y los sueros fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su procesamiento en la Universidad de Brock en Canadá. La determinación de anticuerpos IgG se realizó por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando el kit AccuDiag™ *Strongyloides* IgG de la casa Immuno Diagnostics. El principio de la prueba se basa en poner a reaccionar el suero del participante con el antígeno adsorbido en los pocillos de las placas de ELISA. Después se agrega un anti-anticuerpo marcado con una enzima, que en presencia del sustrato produce color amarillo, cuya intensidad es leída con un espectrofotómetro para determinar la absorbancia. Se considera un resultado positivo valores de absorbancia mayores a 0.2 (Anexo 10).

3.12.3. Determinación de IgE total

Para la determinación de IgE total se utilizaron las muestras de suero sanguíneo que fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su procesamiento en la Universidad de Brock. Se utilizó el kit Bio-Plex Pro™ Human IgE Isotyping de la casa Bio-Rad Laboratories Inc., que consiste en un inmunoensayo que se lleva a cabo con la ayuda de perlas magnéticas. El principio del ensayo es similar a una ELISA tipo sándwich: los anticuerpos dirigidos a reconocer la IgE se unen covalentemente a las perlas magnéticas, estas reaccionan con la muestra que contiene la IgE. Después es necesario utilizar un anticuerpo de detección biotinilado para completar un complejo sándwich. La detección final se da con la adición de estreptavidina-Ficoeritrina (SA-PE) que sirve como un indicador fluorescente. Este procedimiento se llevó a cabo en el Sistema Magpix® (manufacturado por Luminex) (Anexo 11). El resultado se expresa en UI/L. Para este estudio, una determinó utilizar como punto de corte una concentración de IgE sérica ≥ 1000 UI/L, debido a su mayor importancia clínica (39).

3.12.4. Cuantificación de eosinofilia y hemoglobina

El conteo absoluto de eosinófilos se realizó a partir de una muestra de sangre total con anticoagulante K2-EDTA en el analizador automatizado ABX Pentra 120 manufacturado por ABX Diagnostics, Inc. Este sistema utiliza el sistema de flujo de impedancia y lectura de absorbancia. El resultado se expresa en número de eosinófilos/ μ L y como porcentaje. Se considera un valor normal $<0.450 \times 10^9/L$ y de 3-5%.

Determinación de hematocrito y hemoglobina: el análisis de la sangre total con anticoagulante K2-EDTA para determinar hemoglobina y hematocrito sirvió para la

determinación del grado de anemia de acuerdo a los estándares establecidos por la OMS (55), que define anemia en aquellos individuos que tienen un valor de Hb<11.5g/dL o hematocrito <34%. Estos valores también se determinaron con el analizador automatizado ABX Pentra 120 manufacturado por ABX Diagnostics, Inc.

3.13. Análisis de datos

El análisis de datos fue basado en estudios similares publicados en la literatura científica (18, 39, 56).

Para cada uno de los geohelminthos se calcularon las prevalencias puntuales con intervalos de confianza del 95% así como prevalencia de intensidad de infección. Para el análisis de IgE y conteo de eosinófilos se calcularon las medias geométricas debido a que sus distribuciones no se ajustan a la normalidad.

Las diferencias de las medias entre los dos grupos de población se estimaron utilizando la técnica no paramétrica de Mann-Whitney (Wilcoxon). Para determinar asociaciones estadísticas entre las variables de interés, se realizaron análisis de regresión logística bivariado y multivariado, y se calcularon los Odds Ratios (OR) crudos y ajustados, y valores p . El nivel de significancia estadística se fijó en $p \leq 0.05$.

3.14. Consideraciones éticas

El estudio involucró participantes humanos e implicó “riesgo biológico mínimo” por el uso de la técnica invasiva de venopunción. Adicionalmente, involucró menores de edad que se consideran poblaciones vulnerables. Por tanto, el estudio fue sometido a revisiones por comités de ética de la investigación y recibió aprobación de los comités de ética de la

Universidad Nacional Autónoma de Honduras, el CEI-MEIZ (Protocolo # 01-2015 con fechas de aprobación del 01 de agosto de 2015), y por “*Certificate of Ethics Clearance for Human Participant Research*” de la Universidad de Brock (Protocolo# 14-224 - SANCHEZ, con fechas de aprobación 5 de agosto de 2015), (Anexo 12 y 13).

3.15. Aspectos de bioseguridad

Tanto las muestras de heces como las sanguíneas y los reactivos utilizados en el estudio fueron manejados siguiendo los lineamientos básicos del Comité de Bioseguridad de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH. Los agentes biológicos estudiados representan un riesgo mínimo por lo que se trabajó en laboratorio de bioseguridad nivel 2.

3.16. Financiamiento

Este estudio fue financiando por una beca sustantiva de la Dirección de Investigación Científica y Posgrados de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (DICyP) y un aporte de la Universidad de Brock, Ontario, Canadá.

Capítulo 4: Resultados

4.1 Características de las poblaciones de estudio

El estudio se llevó a cabo entre los meses de agosto de 2015 y junio de 2016. El proceso de socialización del proyecto se realizó en el mes de junio, la recolección de las muestras en el mes de agosto y los diferentes análisis en las fechas posteriores.

La escuela de la aldea rural, Santa Cruz del Junco, se encuentra ubicada a 10 km del centro de la ciudad de Tela. Cuenta con un edificio de 4 aulas y 2 servicios sanitarios. La matrícula total de niños en primero a sexto grados es de 92 alumnos. Las calles de la comunidad son de tierra, pero hay alcantarillado y energía eléctrica. Las casas de habitación cuentan con agua potable y energía eléctrica.

La escuela de la ciudad de Tegucigalpa se encuentra ubicada en el centro de Tegucigalpa. Es un edificio de 2 pisos y cuenta con 6 aulas, biblioteca, gimnasio, aula de computación y 6 servicios sanitarios. La matrícula total de niños en primero a sexto grados en la jornada diurna es de 154 alumnos. Las calles de la zona son pavimentadas y las casas de habitación cuentan con agua potable y energía eléctrica.

En total, se enlistaron 144 participantes, 71 escolares de la escuela de Tegucigalpa y 73 de la escuela de la aldea El Junco en Tela.

La edad de los niños fue similar en las dos escuelas, y estuvo comprendida entre los 9.8 (D.E. 1.5) y 9.9 (D.E. 2.1) años. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el sexo o edad de los dos grupos de estudio.

La condición de las viviendas fue bastante similar para los dos grupos. Sin embargo, comparado con Tegucigalpa, más viviendas en la aldea de Tela reportaron tener el piso de

tierra (43.8%) y, a pesar de que el 99% de ambos grupos tenían servicio sanitario, más niños de la aldea reportaron defecar al aire libre (20.5%).

4.2 Indicadores nutricionales

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de escolares, tanto para las concentraciones de hemoglobina como para la categorización de anemia. Como se presenta en la tabla 3, comparados con los de Tegucigalpa, las concentraciones de hemoglobina fueron más bajas para los niños de la aldea de Tela; incluso la desviación estándar de los valores fue más amplia. Hubo más niños con anemia en la aldea de Tela (20.5%) que en los de Tegucigalpa (4.2%).

4.3 Parasitismo intestinal

Los hallazgos de HTS fueron marcadamente diferentes al comparar los dos grupos. La tabla 3 muestra que el nivel de parasitismo en los niños de la aldea de Tela fue mucho más elevado que en los niños de la ciudad (47.9% vs. 7%, $p < 0.001$). En Tegucigalpa solamente se encontró *T. trichiura*, mientras que en la aldea se encontraron las tres especies de HTS más importantes. Igualmente, la presencia de protozoos patógenos o potencialmente patógenos (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*) fue más frecuente en los niños de la aldea.

Otro dato importante de mencionar es la diferencia en seropositividad por *S. stercoralis* entre ambas poblaciones. Casi el 20% de los niños de la aldea de Tela fueron seropositivos, comparado con menos de 5% en Tegucigalpa. Tal diferencia resultó ser estadísticamente significativa $p=0.005$.

Tabla 3. Características de las poblaciones de estudio.

Características	Tegucigalpa <i>n</i> = 71	Tela <i>n</i> = 73	Valor <i>p</i>
Edad — media (<i>DE</i>)	9.8 (1.5)	9.9 (2.1)	0.901
Niñas	34 (47.9%)	37 (50.7%)	0.737
Condiciones de las viviendas			
Piso de tierra (completo o parcial)	1 (1.4%)	32 (43.8%)	< 0.001
Acceso a servicio sanitario/letrina	70 (98.6%)	71 (97.3%)	0.576
Acceso a agua potable	65 (91.5%)	69 (94.5%)	0.483
Número de personas por habitación — media (<i>DE</i>)	2.8 (1.5)	3.1 (1.3)	0.222
Prácticas higiénicas			
Defecación al aire libre	5 (7.0%)	15 (20.5%)	0.019
Caminar descalzo al aire libre	34 (47.9%)	52 (71.2%)	0.004
Uñas sucias al momento de la entrevista	44 (62.0%)	46 (63.0%)	0.897
Poseen perros	39 (54.9%)	54 (74.0%)	0.017
Indicadores nutricionales			
Hemoglobina (g/dL) — media (<i>DE</i>)	13.2 (0.7)	12.6 (1.0)	< 0.001
Anemia	3 (4.2%)	15 (20.5%)	0.003
Conocimientos sobre geohelminchos y tratamiento			
Conoce los geohelminchos	31 (43.7%)	57 (78.1%)	< 0.001
Recuerda haber tenido geohelminchos	37 (52.1%)	52 (71.2%)	0.009
Recibió tratamiento para geohelminchos \geq 6 meses	7 (12.5%)	20 (30.3%)	0.018

Perfil parasitario general

Prevalencia general de geohelminintos	5 (7.0%)	35 (47.9%)	< 0.001
Prevalencia general de <i>Ascaris lumbricoides</i>	0 (0.0%)	10 (13.7%)	0.001
Prevalencia general de <i>Trichuris trichiura</i>	5 (7.0%)	30 (41.1%)	< 0.001
Prevalencia general de Ancilostomatídeos	0 (0.0%)	8 (11.0%)	0.004

Perfil parasitario especie-específico

Infecciones por <i>Ascaris lumbricoides</i>	---	4 (11.4%)	0.001
Infecciones por <i>Trichuris trichiura</i>	5 (100.0%)	18 (51.4%)	< 0.001
Infecciones por Ancilostomatídeos	---	1 (12.5%)	< 0.001
Infecciones mixtas	---	12 (34.3%)	< 0.001
Infecciones moderadas por <i>Ascaris lumbricoides</i>	---	1 (10.0%)	0.001
Infecciones moderadas por <i>Trichuris trichiura</i>	1 (20.0%)	6 (20.0%)	1.000
Seroprevalencia de <i>Strongyloides stercoralis</i>	3 (4.2%)	14 (19.2%)	0.005
Prevalencia general de protozoos patógenos	5 (7.0%)	18 (24.7%)	0.004

4.4. Alergias

Para determinar si las alergias eran más frecuentes en la zona urbana donde la frecuencia de geohelmintiasis es baja, se analizaron las respuestas de los cuestionarios y se agruparon las alergias en los siguientes grupos: (i) rinitis alérgica, (ii) asma, (iii) de la piel; y (iv) gastrointestinales. También se recabó información sobre historia familiar de alergias. Como factores biológicos asociados a las alergias se determinaron niveles de eosinofilia periférica y concentraciones de IgE. Dichas variables se analizaron tanto por lugar de residencia como por la presencia o ausencia de geohelmintiasis, tal como se demuestra en la tabla 4.

Al analizar por lugar de residencia se encontró que las alergias de la piel y la historia de alergia familiar fueron más frecuentes en los niños de la ciudad, y que dicha diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.006$ y $p=0.001$, respectivamente).

Al analizar la frecuencia de alergias por presencia o ausencia de geohelmintiasis, se encontró que la rinitis alérgica, alergias de la piel, e historia familiar fueron significativamente menos frecuente en los niños positivos por geohelmintiasis. En otras palabras, la presencia de HTS parece ser un factor protector contra dichas alergias.

La tabla 4 también muestra que se observó mayor número de casos de eosinofilia en los niños padeciendo de geohelmintiasis comparados con los menos parasitados. Igualmente, se determinaron concentraciones más altas de IgE tanto en los niños de la aldea como en los parasitados por HTS ($p < 0.001$ en ambos casos).

Tabla 4. Alergias en las poblaciones de estudio de acuerdo con el lugar y la presencia de geohelminthos.

Características	Tegucigalpa <i>n</i> = 71	Aldea Tela <i>n</i> = 73	Valor <i>p</i>	HTS (-) <i>n</i> = 104	HTS (+) <i>n</i> = 40	Valor <i>p</i>
Tipo de alergia						
Rinitis alérgica	50 (71.4%)	47 (64.4%)	0.367	75 (72.8%)	22 (55.0%)	0.041
Asma	30 (42.9%)	39 (53.4%)	0.206	53 (51.5%)	16 (40.0%)	0.218
Alergias de la piel	22 (31.4%)	9 (12.3%)	0.006	27 (26.2%)	4 (10.0%)	0.035
Alergias gastrointestinales	7 (10.0%)	8 (11.0%)	0.852	11 (10.7%)	4 (10.0%)	0.905
Historia alérgica de familiar	29 (42.0%)	11 (15.5%)	0.001	39 (38.6%)	1 (2.6%)	< 0.001
Eosinofilia (≥ 500 eosinófilos/ μ L)	9 (12.7%)	16 (21.9%)	0.143	13 (12.5%)	12 (30.0%)	0.013
Hiper IgE (≥ 1000 IU/mL)	11 (15.5%)	39 (53.4%)	< 0.001	26 (25.0%)	24 (60.0%)	< 0.001

La figura 5 muestra una visualización más rápida de los resultados de acuerdo a la residencia y la presencia de geohelminthos.

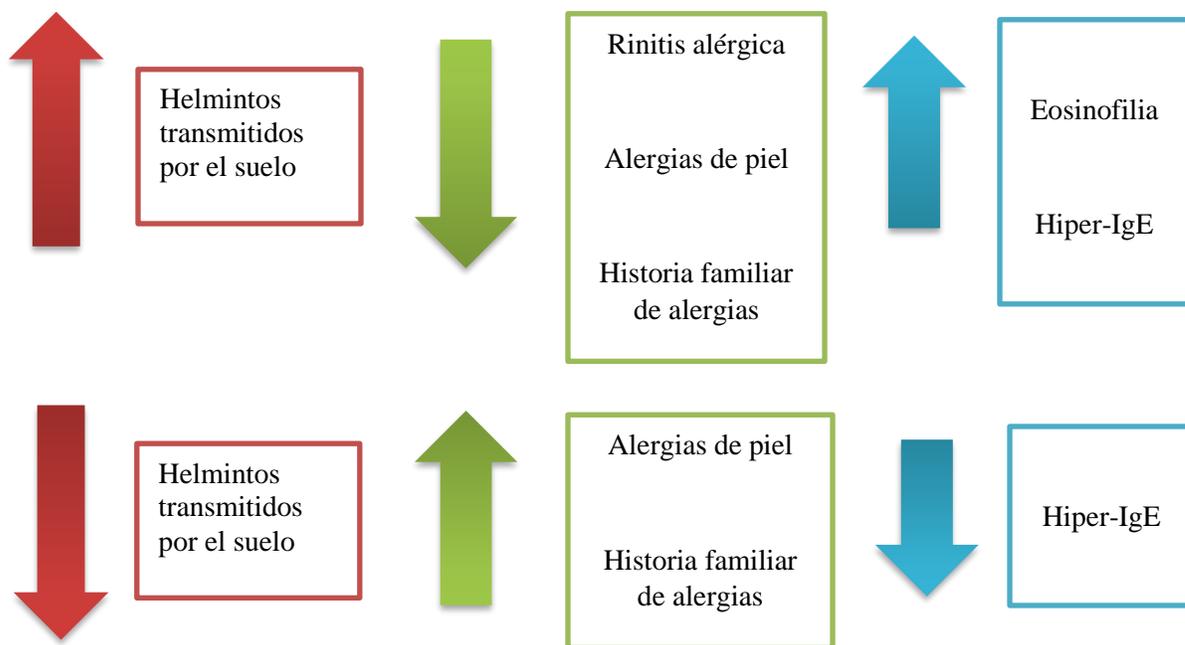


Figura 5. Diferencia en frecuencias de alergias, eosinofilia y concentraciones de IgE entre los grupos de estudio.

4.5. Diferencias en eosinofilia e hiper-IgE

La tabla 5 demuestra que los niños que reportaron rinitis alérgica presentaron concentraciones más altas de eosinófilos comparados con los que no reportaron tal padecimiento. Esta fue la única diferencia marginalmente significativa al comparar los diferentes tipos de alergia con estos valores hematológicos. Los niños con alergias dermatológicas presentaron valores más bajos de IgE que los niños reportando cualquier otro tipo de alergia ($p=0.012$), en comparación con niños que no reportaron ningún tipo de alergia.

Los niños con infecciones por HTS presentaron valores más altos de IgE que los no parasitados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para las tres especies

estudiadas. Por otra parte, fue más frecuente detectar eosinofilia en los niños infectados con *T. trichiura* y ancilostomatídeos, pero no con *A. lumbricoides*.

Tabla 5. Alergias y geohelminintos de acuerdo con el conteo de eosinófilos y nivel de IgE.

Condición	Eosinófilos/ μ L	Valor p	IgE (IU/mL)	Valor p
	MG (95 % IC)		MG (95 % IC)	
Alergias				
Sin alergias	176.6 (133.0-234.5)	---	476.4 (268.7-844.6)	---
Rinitis alérgica	252.9 (215.3-297.0)	0.056	465.0 (323.7-668.1)	0.899
Asma	249.9 (204.8-304.9)	0.119	515.3 (326.4-813.4)	0.768
Alergias dermatológicas	230.7 (184.1-289.1)	0.252	171.0 (93.1-314.1)	0.012
Alergias gastrointestinales	274.6 (165.8-454.8)	0.182	571.3 (245.6-1329.0)	0.694
Geohelminintos				
Sin geohelminintos	191.7 (165.0-222.8)	---	289.8 (210.6-398.9)	---
<i>Ascaris lumbricoides</i>	282.0 (142.2-559.5)	0.182	1738.9 (697.2-4337.1)	0.017
<i>Trichuris trichiura</i>	386.7 (303.5-492.7)	< 0.001	1461.1 (811.1-2632.1)	< 0.001
Ancilostomatídeos	569.1 (381.3-849.3)	< 0.001	3405.5 (1141.1-10163.2)	< 0.001

MG: media geométrica, IC: intervalo de confianza

4.6. Asociaciones entre eosinofilia e IgE con alergias y geohelminintos

No se demostró ninguna asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones de eosinófilos o de IgE y las alergias reportadas. En cambio, la hiper IgE y eosinofilia estuvieron fuertemente asociadas con infecciones por *Trichuris trichiura* y ancilostomatídeos.

La presencia de *A. lumbricoides* no estuvo significativamente asociada a ninguno de estos dos parámetros, tal como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Eosinofilia e hiper IgE en alergias y geohelminfos.

Condición	Eosinofilia		Eosinofilia		Hiper IgE		Hiper IgE	
	OR (95 % CI)	Valor p	ADJ-OR (95 % CI)	Valor p	OR (95 % CI)	Valor p	ADJ-OR (95 %CI)	Valor p
Alergias								
Sin alergias	---		---		---		---	
Rinitis alérgica	2.3 (0.7-7.2)	0.160	2.4 (0.7-7.8)	0.138	1.0 (0.4-2.2)	0.993	1.1 (0.5-2.4)	0.858
Asma	2.3 (0.7-7.5)	0.172	2.4 (0.7-8.3)	0.151	1.3 (0.5-2.9)	0.585	1.4 (0.6-3.3)	0.390
Alergias de la piel	1.2 (0.3-5.4)	0.791	1.1 (0.2-5.3)	0.904	0.3 (0.1-0.9)	0.043	0.3 (0.1-1.1)	0.072
Alergias gastrointestinales	3.0 (0.6-14.3)	0.167	3.2 (0.7-15.2)	0.139	1.2 (0.3-4.3)	0.744	1.2 (0.3-4.6)	0.802
Geohelminfos								
Sin geohelminfos	---		---		---		---	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3.0 (0.7-13.1)	0.145	2.1 (0.5-8.9)	0.313	4.5 (1.2-17.3)	0.029	3.8 (0.9-15.6)	0.065
<i>Trichuris trichiura</i>	3.6 (1.5-9.1)	0.005	3.8 (1.4-10.4)	0.008	4.5 (2.0-10.1)	< 0.001	4.1 (1.8-9.4)	0.001
Ancilostomatídeos	11.7 (2.5-55.1)	0.002	10.1 (2.1-47.9)	0.003	21 (2.4-180.5)	0.006	18.6 (2.3-147.1)	0.006

Capítulo 5: Discusión

Este es el primer estudio realizado en Honduras que establece el perfil de eosinofilia e hiper IgE en relación a los parásitos intestinales en dos poblaciones diferentes. A diferencia del estudio realizado por Gabrie y col. (18), se comparó una población rural, donde la infección por geohelminthos es común con una población urbana, donde este tipo de infecciones son menos frecuentes. Además, se incluyó información obtenida a partir de los participantes y sus familiares sobre la historia de alergias de diferentes tipos en ambas poblaciones para descartar que los hallazgos no fueran afectados por condiciones inmunológicas propias de los participantes (57).

Los hallazgos encontrados en este estudio confirman lo descrito en la literatura; se reportó que la rinitis alérgica, las alergias de piel y la historia familiar de alergias eran menos frecuentes en niños con HTS. Todo esto es congruente con una respuesta Th2 modificada en la cual hay producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25 e IL-33 (19, 27). Por medio de varios mecanismos intercelulares, estas citocinas coordinan la diferenciación de linfocitos T al tipo Th2, y el cambio de producción de clase de anticuerpos en los linfocitos B, que pasan de producir IgG a IgE, todo ello para regular la presencia de los parásitos (57). Si bien es cierto que las alergias presentan una respuesta inmune de tipo Th2, la respuesta generada hacia las infecciones por HTS es modificada mediante la activación de Tregs y su consecuente producción de IL10, este mecanismo de regulación induce un estado de hipo-respuesta inmune que previene el desarrollo de las alergias (58). De hecho, en un estudio reciente en dos países (Cuba y Camboya) con niños en edad escolar, no se encontró ninguna asociación

con inflamación intestinal o sistémica en aquellos individuos que presentaban infecciones por HTS (59), lo que afirma la importancia de la células Tregs en el proceso de la respuesta inmune generada en presencia de estos parásitos.

Desde el punto de vista de la hipótesis de la higiene, los resultados obtenidos en este estudio reflejan la relación inversa entre las enfermedades relacionadas con la producción de IgE y la presencia de HTS (60). Estudios realizados en Gabón, Brasil y Ecuador, apoyan el hecho de que las respuestas alérgicas disminuyen en aquellos individuos que constantemente están expuestos a diferentes helmintos, generalmente mediados por la regulación liderada por las Tregs y la producción de IL10 (8, 26).

Prevalencia de Helmintos Transmitidos por el Suelo

Los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la prevalencia de HTS confirman los hallazgos de la encuesta nacional llevada a cabo en 2014: en la zona rural se detectó *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y ancilostomatídeos, con una prevalencia general del 47.9%; mientras que en la zona urbana solo se detectó *T. trichiura*, con una prevalencia general del 5%. La encuesta nacional publicada por Mejía y col. (2014) reporta que las poblaciones de la zona II —donde se encuentra ubicada Santa Cruz del Junco— presentan prevalencias cercanas o superiores al 50%, en tanto en la zona IV —donde se encuentra Tegucigalpa— presentan prevalencias menores al 25%.

No se encontró infecciones severas en ninguna de las poblaciones estudiadas, esto puede ser debido a que las escuelas en estudio forman parte del programa anual de desparasitación de acuerdo a las normas de la OMS (17), en el cual reciben una tableta de albendazol de 400 mg una o dos veces al año, lo que permite que las prevalencias de los HTS se mantengan en niveles leves o moderados de infección. En el caso de la zona urbana, donde las condiciones de vida son diferentes (piso de cemento, agua potable, etc.) solamente se encontró *Trichuris trichiura*, lo cual puede explicarse de diferentes formas como ser, infecciones viejas o que presentan algún tipo de resistencia al medicamento, o una infección severa que necesita mayor dosis de tratamiento (3 días). El hecho de no encontrar *Ascaris lumbricoides* y ancilostomatídeos en la zona urbana, se relaciona con la administración del medicamento en los programas de desparasitación, ya que la eficacia del albendazol es mayor para este HTS; y específicamente en el caso de los ancilostomatídeos, el uso de calzado por parte de los participantes, las condiciones de suelo (pavimentación) y las condiciones climatológicas son factores que inciden en las prevalencias de este tipo de parásitos en esta zona.

En cuanto a *Strongyloides stercoralis*, el estudio realizado se basó en el uso de una prueba inmunoenzimática que permite la detección de anticuerpos IgG, cuya presencia en suero puede indicar una infección activa o una infección reciente. La validez del resultado de este tipo de pruebas depende de la sensibilidad y la especificidad del ensayo utilizado, y no necesariamente implica la presencia del parásito (61). En nuestro estudio la prueba utilizada tiene 100% de sensibilidad y 100% especificidad, por lo que podemos confiar en la veracidad de los datos obtenidos. Así que, con una seroprevalencia de casi el 20% entre los participantes con residencia rural, se puede concluir que el contacto con este parásito es frecuente, ya que

se demostró la presencia de ancilostomatídeos, los cuales tienen el mismo tipo de transmisión por vía cutánea lo que podría considerarse como un factor de exposición al parásito. Es importante que otros estudios determinen la prevalencia real de esta infección en esta población, preferiblemente por métodos moleculares, ya que los métodos parasitológicos tradicionales tienden a sub-identificar estas infecciones. Por ejemplo, en un estudio realizado en el Hospital del municipio de Tela (municipio al cual pertenece la aldea de nuestro estudio) el examen directo de heces solamente reveló 0.17% de prevalencia de este parásito (62). Aun cuando *S. stercoralis* esté ocasionando infecciones subclínicas o leves, la importancia de este helminto como parásito oportunista no puede ignorarse.

Eosinofilia

Las infecciones por HTS se relacionan directamente con la presencia de eosinofilia periférica debido a la polarización de la respuesta inmune Th2 que caracteriza la interacción hospedero-parásito. De hecho, la eosinofilia puede utilizarse como un marcador biológico que sugiere una infección helmíntica. En países no endémicos, el hallazgo de elevadas concentraciones de eosinófilos en pacientes que no presentan patologías asociadas a la eosinofilia, apoya la sospecha clínica de parasitismo intestinal o tisular. El grupo de investigación español de Bellhansen-García y col. (2014) describe esta situación con inmigrantes de África y América Latina a España, en quienes se demostró que la eosinofilia absoluta y la hiper-IgE estuvieron significativamente relacionadas con la presencia de infecciones helmínticas, principalmente filariasis, strongiloidiasis y esquistosomiasis. Otro estudio realizado en Filipinas encontró un 58% de eosinofilia, de los cuales el 69% estaban parasitados con HTS (63).

En Honduras, Espinoza y col. (1999) realizaron un estudio en pacientes con altos conteos de eosinófilos, donde el 45% de los pacientes estudiados presentaban geohelmintiasis. En dicho estudio no se exploraron otras variables asociadas a la eosinofilia, tales como los procesos alérgicos. Un estudio más reciente (18), realizado en una población infantil del área rural de Honduras, encontró valores mayores en el conteo de eosinófilos en aquellos individuos parasitados en comparación con los no parasitados. Además, en el caso de *T. trichiura* se encontró una relación importante entre eosinofilia y la presencia de este parásito específicamente. En el presente estudio, encontramos la misma asociación con *T. trichiura*, pero no con *A. lumbricoides*. Debido a que los adultos de *T. trichiura* viven insertados en la mucosa del colon, mientras que los de *A. lumbricoides* viven libres en el lumen del intestino delgado, el primero es más propenso a estimular una reacción alérgica tisular con infiltración eosinofílica que eventualmente se expresa en circulación periférica. Sin embargo, en su fase de migración larvaria por el pulmón, *A. lumbricoides* puede generar una respuesta eosinofílica la cual generalmente se asocia en las primoinfecciones. Una vez que la parasitosis se vuelve crónica, los niveles de eosinófilos circulantes empiezan a disminuir (28, 48, 64).

Hiper-IgE

Niveles elevados de IgE son característicos de enfermedades alérgicas e infecciones helmínticas. Algunas condiciones inflamatorias, inmunodeficiencia y ciertas malignidades también pueden ocasionar eosinofilia (65). En ciertos casos, los niveles de IgE son tan elevados (≥ 1000 IU/mL) que la condición se denomina hiper-inmunoglobulinemia E. Esta

no es muy común, y se ha asociado a dermatitis atópica, micosis pulmonares, raras inmunodeficiencias primarias e infecciones helmínticas. El presente estudio aporta evidencia de la asociación entre los HTS y la hiper-IgE. Por la diferencia estadísticamente significativa entre la relación de los HTS en hiper-IgE encontrada entre los pobladores de Tela comparados con los de Tegucigalpa, se puede deducir que los pobladores rurales están expuestos a antígenos diferentes, posiblemente parásitos intestinales. La evidencia más directa se obtiene al comparar por el mismo parámetro a los participantes de Tela versus los de Tegucigalpa: para una prevalencia de hiper-IgE para los primeros de 60%, y de 25.0% para los segundos ($p < 0.001$).

Es importante tomar en cuenta que además de la asociación con HTS, los valores de IgE total también pueden estar relacionados con infecciones por ciertos protozoos (ej., *Cystoisospora belli*) y con procesos alérgicos como asma, dermatitis y rinitis (43). Sin embargo, el hecho de presentar altos niveles de IgE en una zona constantemente expuesta a los parásitos intestinales como es el caso de Tela, puede pensarse en una relación directa entre la presencia de HTS e hiper IgE.

Capítulo 6: Conclusiones

Para concluir, el presente estudio confirma que las parasitosis intestinales siguen siendo un problema de salud pública en las áreas rurales del país y confirma por primera vez en Honduras que las geohelmintiasis están fuertemente asociadas a la eosinofilia y las elevadas concentraciones de IgE en niños parasitados. También se reporta que en general las infecciones por HTS ejercen una modulación protectora contra los procesos alérgicos.

Específicamente, se pudieron lograr los objetivos de investigación propuestos, como se discute a continuación:

1. Establecer la prevalencia e intensidad de las infecciones por helmintos transmitidos por el suelo en ambas poblaciones de estudio.

Se demostró que el nivel de parasitismo en los niños escolares de la aldea de Tela fue mucho más elevado que en los niños del área urbana de Tegucigalpa. La variedad de especies de parásitos también mostró una marcada diferencia. En Tegucigalpa solo se encontró *T. trichiura*, mientras que en la aldea de Tela se encontraron las tres especies de HTS. La mayoría de las infecciones diagnosticadas fueron de intensidad leve, con muy pocas categorizadas como moderadas. Además, se comprobó por primera vez en Honduras que la prevalencia de *S. stercoralis* puede ser mucho más alta de lo que se ha reportado, con casi 20% de seropositividad en los niños de la aldea de Tela. La presencia de protozoos potencialmente patógenos (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/dispar*) fue también mucho más frecuente en los niños de la aldea de Tela.

2. Establecer la prevalencia de eosinofilia e hiper IgE total circulante en ambas poblaciones de estudio.

Se logró determinar los niveles de ambos parámetros en las dos poblaciones. Las pruebas utilizadas para estas determinaciones proveen información que la población rural está expuesta a antígenos que generan este tipo de respuesta en la población estudiada.

3. Determinar asociación estadística entre las infecciones por HTS y la eosinofilia e hiper IgE en ambas poblaciones.

Las HTS estuvieron asociadas de forma estadísticamente significativa tanto a la eosinofilia y las concentraciones extremas de IgE (hiper-IgE). Esta relación entre parásitos, eosinófilos e hiper IgE demuestra la constante exposición sobre todo de la población rural a los HTS. Además, el conteo de eosinófilos y los niveles de IgE pueden ser utilizados como marcadores biológicos en presencia de geohelminCIAS ya que varios estudios demuestran su presencia en caso de las helmintiasis transmitidas por el suelo.

Capítulo 7: Limitaciones, fortalezas del estudio y futuras investigaciones

Limitaciones y fortalezas

Se reconoce que el presente estudio incluyó una muestra pequeña y que por tanto el poder estadístico fue limitado, abajo del mínimo del 80% deseado. Sin embargo, esta limitación no impidió encontrar diferencias estadísticamente significativas en las variables de interés. Esto sugiere que con una muestra más grande, dichas diferencias podrían ser aun más marcadas. También, la naturaleza transversal del estudio no permite inferir causalidad, sino solo asociación entre variables. Sin embargo, utilizando el conocimiento construido por expertos, así como los marcos de plausibilidad biológica y epidemiológica, es posible deducir que los HTS ejercen una influencia en mecanismos inmunes celulares y humorales en la población parasitada. Estudios futuros deben utilizar pruebas más objetivas para determinar alergias. La utilización de pruebas cutáneas o técnicas inmunológicas brindarían información más objetiva que la que brinda el cuestionario de participantes, el cual está sujeto a sesgos de memoria y apreciación subjetiva.

Entre las fortalezas del estudio se reconocen la integración de dos grupos de población; algo que se hace por primera vez en el país. La confiabilidad de los métodos diagnósticos es también una fortaleza de este estudio, ya que permiten establecer resultados confiables y reproducibles. Los datos obtenidos aportan información importante sobre el comportamiento del sistema inmune en población escolar parasitada por HTS, y abre puertas a investigaciones futuras, tanto en poblaciones rurales como urbanas. Por último, las poblaciones en estudio tuvieron la oportunidad de recibir educación en salud y el tratamiento respectivo para aquellos individuos que presentaron infección parasitaria.

Futuras investigaciones

1. Es importante seguir investigando las HTS en Honduras e identificar los focos geográficos donde estas infecciones continúan afectando la salud de la población infantil.
2. Sería conveniente implementar un estudio longitudinal para determinar el impacto de los HTS y otras parasitosis en la polarización del sistema inmune hacia una respuesta Th2 y su resolución después del tratamiento y posterior reinfección.
3. Se debe expandir el conocimiento en cuanto a la epidemiología e importancia clínica de *S. stercoralis* en Honduras.
4. Explorar la interacción entre los HTS y la microbiota intestinal para determinar la mutua influencia de ambos grupos dentro del intestino humano.

Referencias bibliográficas

1. WHO. 2012. Soil-transmitted helminthiases : eliminating as public health problem soil-transmitted helminthiases in children : progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. World Health Organization, Geneva.
2. Cooper PJ, Chico ME, Platts-Mills TA, Rodrigues LC, Strachan DP, Barreto ML. 2015. Cohort Profile: The Ecuador Life (ECUAVIDA) study in Esmeraldas Province, Ecuador. *Int J Epidemiol* 44:1517-27.
3. Zaph C, Cooper PJ, Harris NL. 2014. Mucosal immune responses following intestinal nematode infection. *Parasite Immunol* 36:439-52.
4. Sanchez AL, Mahoney DL, Gabrie JA. 2015. Interleukin-10 and soil-transmitted helminth infections in Honduran children. *BMC Res Notes* 8:55.
5. Mehta RS, Rodriguez A, Chico M, Guadalupe I, Broncano N, Sandoval C, Tupiza F, Mitre E, Cooper PJ. 2012. Maternal geohelminth infections are associated with an increased susceptibility to geohelminth infection in children: a case-control study. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1753.
6. Heylen M, Ruysers NE, Gielis EM, Vanhomwegen E, Pelckmans PA, Moreels TG, De Man JG, De Winter BY. 2014. Of worms, mice and man: an overview of experimental and clinical helminth-based therapy for inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 143:153-67.
7. Kidd P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8:223-46.
8. Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. 2014. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol* 177:38-46.
9. Rook GA. 2012. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42:5-15.
10. Alcantara-Neves NM, de SGBG, Veiga RV, Figueiredo CA, Fiaccone RL, da Conceicao JS, Cruz AA, Rodrigues LC, Cooper PJ, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML. 2014. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes* 7:817.
11. Cooper PJ. 2004. The potential impact of early exposures to geohelminth infections on the development of atopy. *Clin Rev Allergy Immunol* 26:5-14.
12. Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW. 2014. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity. *Front Immunol* 5:61.
13. Figueiredo CA, Alcantara-Neves NM, Veiga R, Amorim LD, Dattoli V, Mendonca LR, Junqueira S, Genser B, Santos M, de Carvalho LC, Cooper PJ, Rodrigues L, Barreto ML.

2009. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ Health Perspect* 117:845-9.
14. Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M. 2014. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect Dis* 14:1150-62.
 15. Cooper PJ, Moncayo AL, Guadalupe I, Benitez S, Vaca M, Chico M, Griffin GE. 2008. Repeated treatments with albendazole enhance Th2 responses to *Ascaris Lumbricoides*, but not to aeroallergens, in children from rural communities in the Tropics. *J Infect Dis* 198:1237-42.
 16. Mejia Torres RE, Franco Garcia DN, Fontecha Sandoval GA, Hernandez Santana A, Singh P, Mancero Bucheli ST, Saboya M, Paz MY. 2014. Prevalence and intensity of soil-transmitted helminthiasis, prevalence of malaria and nutritional status of school going children in honduras. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3248.
 17. WHO. 2006. Preventive chemotherapy in human helminthiasis : coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions : a manual for health professionals and programme managers.
 18. Gabrie JA, Rueda MM, Rodriguez CA, Canales M, Sanchez AL. 2016. Immune Profile of Honduran Schoolchildren with Intestinal Parasites: The Skewed Response against Geohelminths. *J Parasitol Res* 2016:1769585.
 19. Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 126:18-27.
 20. PAHO. 2011. Prevalence and intensity of infection of Soil-transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries Mapping at second administrative level 2000-2010.
 21. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* 7:37.
 22. Cooper PJ. 2009. Mucosal immunology of geohelminth infections in humans. *Mucosal Immunol* 2:288-99.
 23. Bruschi F. 2014. Helminth infections and their impact on global public health. Springer, New York.
 24. Turner JD, Jackson JA, Faulkner H, Behnke J, Else KJ, Kamgno J, Boussinesq M, Bradley JE. 2008. Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness. *J Infect Dis* 197:1204-12.
 25. McSorley HJ, Loukas A. 2010. The immunology of human hookworm infections. *Parasite Immunol* 32:549-59.

26. Ferluga JK, L.; Kishore, U. 2013. Immune responses induced by parasitic worms. *Microbial Pathogenesis: Infection and Immunity*.
27. Caraballo L, Zakzuk J. 2012. [The evolution of the Th2 immune responses and its relationships with parasitic diseases and allergy]. *Biomedica* 32:145-57.
28. O'Connell EM, Nutman TB. 2015. Eosinophilia in Infectious Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 35:493-522.
29. Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. 2011. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment. *Int Arch Allergy Immunol* 154:195-206.
30. Santiago Hda C, Ribeiro-Gomes FL, Bennuru S, Nutman TB. 2015. Helminth infection alters IgE responses to allergens structurally related to parasite proteins. *J Immunol* 194:93-100.
31. Caraballo L, Coronado S. 2018. Parasite allergens. *Mol Immunol* 100:113-119.
32. Allen JE, Maizels RM. 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol* 11:375-88.
33. Djuardi Y, Wammes LJ, Supali T, Sartono E, Yazdanbakhsh M. 2011. Immunological footprint: the development of a child's immune system in environments rich in microorganisms and parasites. *Parasitology* 138:1508-18.
34. Figueiredo CA, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ, Silva NB, Amorim LD, Alcantara-Neves NM. 2010. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infect Immun* 78:3160-7.
35. Djuardi Y, Supali T, Wibowo H, Kruize YC, Versteeg SA, van Ree R, Sartono E, Yazdanbakhsh M. 2013. The development of TH2 responses from infancy to 4 years of age and atopic sensitization in areas endemic for helminth infections. *Allergy Asthma Clin Immunol* 9:13.
36. Lau S, Matricardi PM. 2006. Worms, asthma, and the hygiene hypothesis. *Lancet* 367:1556-8.
37. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113:832-6.
38. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L. 2003. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 21:579-628.

39. Belhassen-Garcia M, Pardo-Lledias J, Perez del Villar L, Muro A, Velasco-Tirado V, Blazquez de Castro A, Vicente B, Garcia Garcia MI, Luis Munoz Bellido J, Cordero-Sanchez M. 2014. Relevance of eosinophilia and hyper-IgE in immigrant children. *Medicine (Baltimore)* 93:e43.
40. Arinola G, Yaqub S, Rahamon S. 2012. Reduced serum IgE level in Nigerian children with helminthiasis compared with protozoan infection: Implication on hygiene hypothesis. *Annals of Biological Research* 3:5754-5757.
41. Galli SJ, Starkl P, Marichal T, Tsai M. 2016. Mast cells and IgE in defense against venoms: Possible "good side" of allergy? *Allergol Int* 65:3-15.
42. Cooper PJ, Alexander N, Moncayo AL, Benitez SM, Chico ME, Vaca MG, Griffin GE. 2008. Environmental determinants of total IgE among school children living in the rural Tropics: importance of geohelminth infections and effect of anthelmintic treatment. *BMC Immunol* 9:33.
43. Arinola GO, Morenikeji OA, Akinwande KS, Alade AO, Olateru-Olagbegi O, Alabi PE, Rahamon SK. 2015. Serum Levels of Cytokines and IgE in Helminth-Infected Nigerian Pregnant Women and Children. *Ann Glob Health* 81:689-93.
44. Rottem M, Geller-Bernstein C, Shoenfeld Y. 2015. Atopy and Asthma in Migrants: The Function of Parasites. *Int Arch Allergy Immunol* 167:41-6.
45. Lacy P, Rosenberg HF, Walsh GM. 2014. Eosinophil overview: structure, biological properties, and key functions. *Methods Mol Biol* 1178:1-12.
46. Mir A, Benahmed D, Igual R, Borrás R, O'Connor JE, Moreno MJ, Rull S. 2006. Eosinophil-selective mediators in human strongyloidiasis. *Parasite Immunol* 28:397-400.
47. Bouffi C, Rochman M, Zust CB, Stucke EM, Kartashov A, Fulkerson PC, Barski A, Rothenberg ME. 2013. IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF-kappaB-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J Immunol* 191:4317-25.
48. Travers JR, M. E. 2015. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol* 8:464-75.
49. Spencer LA, Weller PF. 2010. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* 88:250-6.
50. Gotlib J. 2015. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 90:1077-89.
51. Huang L, Appleton JA. 2016. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. *Trends Parasitol* 32:798-807.

52. Vieira Silva CC, Ferraz RR, Fornari JV, Barnabe AS. 2012. Epidemiological analysis of eosinophilia and elevation of immunoglobulin E as a predictable and relative risk of enteroparasitosis. *Rev Cubana Med Trop* 64:22-6.
53. WHO. 1991. Basic laboratory methods in medical parasitology. World Health Organization, Geneva.
54. Siddiqui AA, Berk SL. 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis* 33:1040-7.
55. WHO. 2001. Iron deficiency anaemia : assessment, prevention and control : a guide for programme managers. World Health Organization, Geneva.
56. Buendia E, Zakzuk J, Mercado D, Alvarez A, Caraballo L. 2015. The IgE response to *Ascaris* molecular components is associated with clinical indicators of asthma severity. *World Allergy Organ J* 8:8.
57. Logan J, Navarro S, Loukas A, Giacomini P. 2018. Helminth-induced regulatory T cells and suppression of allergic responses. *Curr Opin Immunol* 54:1-6.
58. McSorley HJ, Chaye MAM, Smits HH. 2018. Worms: Pernicious Parasites or Allies Against Allergies? *Parasite Immunol* doi:10.1111/pim.12574:e12574.
59. de Gier B, Pita-Rodriguez GM, Campos-Ponce M, van de Bor M, Chamnan C, Junco-Diaz R, Doak CM, Fiorentino M, Kuong K, Angel-Nunez F, Parker ME, Perignon M, Rojas-Rivero L, Berger J, Polman K, Wieringa FT. 2018. Soil-transmitted helminth infections and intestinal and systemic inflammation in schoolchildren. *Acta Trop* 182:124-127.
60. Zakzuk J. 2016. Inmunorregulación inducida por helmintos: una actualización. *Iatreia* 29:182-193.
61. Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, Muhammad Hafiznur Y, Low HC, Zeehaida M, Noordin R. 2013. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. *Parasite Immunol* 35:174-9.
62. Kaminsky R. 2012. Aspectos epidemiológicos y conceptuales de parasitosis intestinales en el Hospital Regional de Tela, Honduras. *Revista Médica Hondureña* 80:90-95.
63. Sumagaysay JB. 2011. Eosinophilia and Incidence of Soil-Transmitted Helminthic Infections of Secondary Students of an Indigenous School. *Asian Journal of Health* 1:172-184.
64. Ravin KA, Loy M. 2016. The Eosinophil in Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 50:214-27.
65. Tay TR, Bosco J, Aumann H, O'Hehir R, Hew M. 2016. Elevated total serum immunoglobulin E (>1000 IU/mL): implications? *Intern Med J* 46:846-9.

Anexo 1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRE O GUARDIÁN

Fecha:

Introducción:

Hola, nos gustaría invitar a su niño/a participar en un estudio de investigación acerca de los parásitos y gusanos intestinales en niños escolares. Para que podamos invitar e inscribir a sus hijos en este estudio, primero tenemos que hablar con usted y obtener su permiso. Así que nos gustaría darle más información sobre nosotros y sobre lo que se trata este estudio.

¿Quiénes somos?

Somos un grupo de profesores y estudiantes de Canadá y Honduras interesados en llevar a cabo este estudio. Nuestros nombres e instituciones son los siguientes:

En Honduras, el equipo de investigación está integrado por Maritza Canales (profesor), María Mercedes Rueda (profesor), Carol Anahelka Rodríguez (profesor) y Joel García (estudiante de grado) de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. La Dra. Canales es el Coordinador del Proyecto en Honduras.

En Canadá, el equipo de investigación está integrado por la Dra. Ana L. Sánchez (Profesor) y José Antonio Gabrie (estudiante de doctorado) del Departamento de Ciencias de la Salud de Brock University

Invitación:

Le damos las gracias por su presencia aquí hoy. La razón por la que estamos aquí es porque nos gustaría invitar a su hijo que asiste a segundo, tercero o cuarto grado de la escuela para participar en un estudio sobre los parásitos y gusanos intestinales.

Antes de decidirse a participar, es importante que usted entienda el estudio, incluyendo sus riesgos y beneficios de firmar un consentimiento informado. Le invitamos a hacer preguntas si hay algo que no entiende. Este documento que estamos leyendo en voz alta se llama consentimiento informado. Debido a que en realidad este documento es para que usted dé permiso para que su hijo participe en el estudio, el formulario se denomina Consentimiento de Padres/Guardián.

Vamos a dar una copia de esta forma a todos y cada uno de ustedes para que usted la guarde y también queremos leerlos en voz alta el día de hoy para asegurarnos que todos lo entienden. Si usted decide permitir que su hijo participe en el estudio que proponemos, debe ser porque usted entiende completamente el estudio y ha llegado a una decisión informada.

Propósito del estudio

Como hemos dicho, nos gustaría saber más acerca de los parásitos y gusanos intestinales en los escolares. Nos gustaría saber por qué y cómo los niños están obteniendo los gusanos intestinales y si el niño/a tiene algo que ver con la infección. Nos gustaría hacer el estudio con niños de los grados segundo, tercero y cuarto, ya que están en alto riesgo de tener gusanos y también porque son lo suficientemente grandes para entender el estudio y responder a algunas preguntas que nos gustaría hacerles.

¿Qué involucra este estudio?

Si está de acuerdo en participar, se le pedirá que nos de su permiso de platicar con su hijo en la escuela. Necesitaremos aproximadamente 20 minutos de su tiempo.

Ahora queremos darle más detalles acerca del estudio:

El estudio se llevará a cabo en la escuela del niño. Primero tomaremos medidas de talla y peso. Después, le haremos a su hijo algunas preguntas sobre las condiciones de su casa, salud, hábitos de higiene, conocimiento acerca de parásitos, etc. Las preguntas tomarán cerca de 10 a 15 minutos, etc. También le diremos a su niño que nos traiga una muestra de heces y una muestra de sangre para buscar parásitos intestinales, anemia y otros estudios relacionados con los parásitos. En total, necesitaremos cerca de 20 minutos del tiempo de su niño. Por supuesto, que pediremos permiso al maestro para que este tiempo no interfiera con las actividades escolares del niño.

Consideraciones éticas

Le aseguramos que este estudio ha sido revisado y ha recibido aprobación ética por profesionales imparciales de Honduras y Canadá. Específicamente, el comité de ética de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Brock University de St. Catharines, Canadá, han aprobado este estudio. Además, este ha sido aprobado por el director de la escuela de su hijo/a. Esta aprobación significa que no le haremos daño a su hijo/a. No solamente queremos hacer cosas buenas sino que también es nuestra obligación no causar ningún problema como resultado de este estudio.

Riesgos y disconformidad

Este estudio no posee un riesgo serio para su niño/a. Su hijo/a puede sentirse algo avergonzado por traer la muestra de heces pero queremos decirle que nosotros estamos bastante familiarizados con este tipo de muestras y solo nos interesa buscar parásitos en ellas.

También, debe considerar que al dar su hijo una muestra de sangre sentirá un pequeño dolor por el pinchazo de la aguja. Pero queremos asegurarle que este dolor es temporal y desaparecerá en algunos minutos. Nosotros tenemos experiencia en tomar muestras de sangre, así que no causaremos mayor dolor que un pinchazo.

Le aseguramos que ninguna de las muestras de heces o sangre no se le entregara a nadie más, por ninguna razón. Mandaremos una pequeña parte de la muestra a Canadá para examinarlas en sus laboratorios.

Beneficios potenciales

Debido a que viven en un área con todas las condiciones para la transmisión de los gusanos, su hijo está en riesgo de tener infecciones por gusanos y parásitos. Los parásitos pueden causar que los niños no crezcan tan rápido como deberían, porque ellos necesitan nutrientes y sangre. Los parásitos pueden causar un pobre desenvolvimiento escolar porque los niños con gusanos están cansados y no aprenden igual que los niños sin parásitos.

El beneficio directo de sus niños al participar en este estudio es encontrar si está infectado y/o tiene anemia u otros parásitos, el tratamiento indicado será entregado por las autoridades de salud de su comunidad, sin pago. Estos tratamientos pueden mejorar la salud de su hijo/a. Nuestro equipo asegura que el tratamiento esté disponible.

Los resultados de este estudio serán presentados en una reunión como esta. Les presentaremos recomendaciones sobre cómo reducir la infección por gusanos en sus niños y a la comunidad en general.

Además, usaremos la información de este estudio para apoyar los programas de desparasitación de su área. Esto significa que hablaremos con las autoridades de salud y educación acerca del desarrollo de programas de desparasitación en escolares.

Confidencialidad

Toda la información obtenida durante este estudio será guardada de manera confidencial. Su nombre y el nombre de su niño/a no lo sabrá nadie fuera del equipo de investigación, y la información será guardada con llave en un archivo de la oficina del investigador principal. Solo el equipo de investigación tiene acceso a la información, previo permiso del investigador principal. Los resultados de este estudio serán publicados, pero no se utilizará ningún nombre. Su identidad no será revelada en los resultados generales. Con el fin de verificar los datos de la investigación, el oficial de aseguramiento de calidad del comité de ética podrá revisar estos archivos, usted nos dará su permiso de permitir a estas personas revisar esta información.

Participación voluntaria y retiro del estudio

La participación de su niño en este estudio es estrictamente voluntaria. Usted puede reusarse y discontinuar su participación en cualquier momento sin dar ninguna explicación, no habrá ninguna sanción o pérdida de los derechos adquiridos. Si usted suspende la participación de su hijo/a, este no sufrirá perjuicio en cuanto a la atención médica o la participación en cualquier otro estudio de investigación. Se le informará de los nuevos hallazgos que puedan afectar a su hijo/a aun cuando decida no continuar su participación. Si la participación de su hijo/a se interrumpe en cualquier punto en el estudio, es posible que deseemos mantener la información que ya nos diste, si eso está bien con usted. En ese caso, nosotros todavía ofrecemos los resultados de laboratorio si su hijo llegara a estar infectadas y tener el tratamiento disponible para usted en el centro de salud.

Costo y compensación

No existen costos asociados para participar en este estudio. Si su hijo estuviera infectado y/o tuviera anemia y otros parásitos, recibirá el tratamiento indicado a través de las autoridades de salud de su comunidad, sin realizar ningún pago. Estos tratamientos mejoraran la salud de su hijo/a. Nuestro equipo de trabajo se asegurará que el tratamiento esté disponible. Sin embargo, un pequeño detalle será entregado como agradecimiento.

Personas contacto

Si tiene alguna pregunta después de irnos, puede contactar al coordinador del proyecto en Honduras. Su nombre es Dra. Maritza Canales. Ella trabaja en la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) en Tegucigalpa. Su número de teléfono es: 2252-8089; si tienes o conoces a alguien que tiene acceso a correo electrónico, puede escribirle al correo <marygchn@yahoo.com>.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Yo entiendo el contenido de este consentimiento informado, y estoy de acuerdo con la participación de mi hijo en este estudio de investigación. He tenido la oportunidad de preguntar en la sesión de información y todas mis dudas han sido contestadas satisfactoriamente. Se me ha dado suficiente tiempo para considerar la información brindada y buscar consejo si decido hacerlo. Al firmar este consentimiento informado, no he renunciado a ninguno de mis derechos legales, únicamente accedo a que mi hijo/a participe en este estudio.

A. ENTREVISTA Y TOMA DE MEDIDAS

Estoy de acuerdo que mi hijo/a participe en

Una entrevista cara a cara (5-10 minutos) Sí No

Medición de peso y talla Sí No

B. MUESTRAS DE HECES Y SANGRE

Estoy de acuerdo que mi hijo/a provea

Muestra de heces Sí No

Muestra de sangre (2 tubos) Sí No

C. DATOS EN CASO DE RETIRO

Yo autorizo que

Los investigadores pueden conservar los datos de mi hijo/a incluso si se retiran del estudio

Sí No

Soy consciente de que, en cualquier momento, puedo cambiar de opinión con respecto a los acuerdos anteriores, y comunicarles mi decisión a los investigadores sin sanción o pérdida de beneficios a los que tengo derecho.

Sí No

_____ CODE: _____

Child's name School

Nombre del niño Escuela CODIGO

_____ Date

Parent/guardian's name Parent/guardian's signature Firma del Padre/Guardián Fecha

_____ Date
Witness' name Witness' signature Firma del testigo Fecha
Nombre del testigo

Anexo 2. Asentimiento informado

ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS

Fecha:

Introducción:

Hola, estamos aquí porque sus padres nos dieron permiso para hablar con ustedes e invitarlos a participar en un estudio de investigación acerca de parásitos y lombrices intestinales en niños escolares. Aun cuando sus padres nos dieron permiso, nosotros saber si USTED está de acuerdo en participar en este estudio. Así que, queremos hablarles un poco más de lo que se refiere este estudio.

¿Quiénes somos?

Somos un grupo de profesores y estudiantes de Canadá y Honduras interesados en llevar a cabo este estudio. Nuestros nombres e instituciones son:

En **Honduras** el equipo de investigación está integrado por Maritza Canales (Profesor), María Mercedes Rueda (Profesor), Carol Anahelka Rodríguez (Profesor) y Joel García (estudiante de grado) de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. La Dra. Canales es la coordinadora del proyecto en Honduras.

En **Canadá** el equipo de investigación está integrado por Dr. Ana L. Sánchez (Profesor) y José Antonio Gabriele (estudiante de doctorado) del Departamento de Ciencias de la Salud de Brock University.

Invitación:

Les agradecemos su presencia en este lugar el día de hoy. La razón por la que están aquí, es para invitarles a participar en un estudio acerca de parásitos y gusanos intestinales. Voy a tomar unos minutos para hablar de nuestro proyecto, y después les preguntaré si están interesados en formar parte de este proyecto.

¿Porque nos reunimos con ustedes?

Queremos hablarles acerca de un estudio que involucra niños como ustedes en escuelas de su área. Queremos saber si les gustaría estar en este estudio. Queremos encontrar la manera de deshacernos de los parásitos que pueden causar daño a su salud.

¿Qué pasará con usted si participa en este estudio?

Si usted decide formar parte de este estudio hay diferentes cosas que le preguntaremos acerca de su salud y hábitos. Se reunirá con uno de nuestros entrevistadores. Tomaremos medidas de su talla y peso. También le pediremos una pequeña muestra de heces y sangre. Mientras hacemos estas cosas todo lo que tienes que hacer es dar lo mejor. Tomará cerca de 20 minutos contestar las preguntas y darnos tu muestra de sangre. Ese día deberá traer la muestra de heces en un frasco especial que nosotros le daremos.

¿En este estudio existen cosas buenas y cosas malas?

Una de las buenas cosas es que se deshará de los parásitos y si tienes anemia recibirá tratamiento. Esto significa que probablemente se sentirá mejor y será capaz de prestar mayor atención en la escuela. Otra buena

cosa es que usaremos lo que encontremos en este estudio para los escolares alrededor del mundo que también tienen parásitos.

En realidad, no hay cosas malas en este estudio, pero entendemos que puedas sentirte ansioso por proveernos una muestra de heces y por recibir un pinchazo para darnos tu muestra de sangre. Es importante que sepa que los investigadores pueden examinar este tipo de muestra para poder entender su estado de salud. Las heces son un producto natural de nuestro cuerpo y examinarlas es un proceso de rutina si queremos saber si las personas tienen parásitos.

Cuando tomemos su muestra de sangre sentirás algo de dolor. ¿Te han tomado sangre antes?, entonces sabes que este dolor desaparece rápidamente. A veces se puede formar un pequeño moretón en el sitio de donde se tomó la muestra con la aguja, pero este también desaparece en unos días. Es importante que sepas que algunos parásitos causan anemia y que la una manera de saber si tienes anemia es examinando su sangre. Así que usted decide si quiere que examinemos su sangre o no. Usted puede decidir si solamente no da su muestra de heces. De cualquier manera, estará bien para nosotros.

Queremos asegurarle que no daremos sus muestras de heces y sangre a nadie más. Mandaremos una pequeña cantidad de las muestras a Canadá para que ellos puedan examinarla en sus laboratorios.

¿Debe contestar todas las preguntas y hacer todo lo que se le pida?

Las preguntas que haremos son fáciles de responder, pero si no quiere contestarlas, no tiene que hacerlo. Solo dínos. También, si usted no quiere hacer algo más que te pidamos hacer, está bien; solo dínos que es lo que no quiere hacer. Nada malo le sucederá si no quiere decirnos algo o hacer algo de lo que le pidamos. No hay respuestas correctas o incorrectas a estas preguntas.

¿Quién sabrá que está en este estudio?

Las cosas que nos digas y cualquier información que tengamos de usted será guardado en secreto en un lugar con llave. Solo los investigadores tendrán permiso de verlos, sus maestros no los verán al igual que sus padres. Cuando hablemos de este estudio, nunca mencionaremos su nombre.

Participación voluntaria y retiro de este estudio

Su participación en este estudio es estrictamente voluntaria. Puede entrar al estudio ahora y salirte después. Si este es el caso, no necesita darnos explicaciones, solo dínos que ya no quiere continuar. Si sale del estudio, nada malo pasara. Nadie puede reprenderte ni nada por el estilo (incluyendo padres o maestros).

Si no deseas permanecer en este estudio, podemos quedarnos con la información que ya nos dio, si le parece bien. En este caso, les daremos a tus padres tus resultados de laboratorio, especialmente si tiene parásitos. Si es así, vamos a facilitarle el tratamiento en el centro de salud.

¿Tiene alguna pregunta?

Puede hacer preguntas en cualquier momento. Ahora o después. Puede hablarme o a cualquier otro del equipo en cualquier momento durante el estudio.

Si tiene alguna pregunta después de retirarnos, puede decirles a sus padres o maestros que le ayude a contactar al coordinador del proyecto en Honduras. Su nombre es Dra. Maritza Canales. Ella trabaja en la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) en Tegucigalpa. Su número de teléfono es: 2252-8089; si tienes o conoces a alguien con acceso a correo electrónico, puedes escribirle al correo <marygchn@yahoo.com>.

DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Me han explicado los detalles de esta investigación y los entendí. He tenido la oportunidad de preguntar y me han respondido satisfactoriamente. Mi participación en este estudio es libre y voluntaria. Sé que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento si así lo deseo, sin ninguna consecuencia para mí. Estoy de acuerdo en participar.

El niño/a proveyó asentimiento verbal a:

- Ser entrevistado en la escuela por un cuestionario (10-15 min) Sí No
- Ser medido y pesado Sí No
- Proveer una muestra de heces Sí No
- Proveer una muestra de sangre (2 tubos) Sí No
- Autorizar a los investigadores a guardar sus resultados aun cuando se retire del estudio Sí No

El niño esta consiente de:

Ser capaz de cambiar de opinión sobre los acuerdos anteriores, e informar su decisión a los investigadores sin penalidad o pérdida de los beneficios a los cuales tuviese derecho Sí No

_____	_____	CODE: _____
Child's name	School	
Nombre del niño	Escuela	Código
_____	_____	_____
Researcher's name	Researcher's signature	Date (day/month, 2015)
Nombre del investigador	Firma del investigador	Fecha (día/mes, 2015)
_____	_____	_____
Witness' name	Witness' signature	Date (day/month, 2015)
Nombre del testigo	Firma del testigo	Fecha (día/mes, 2015)

Anexo 3. Cuestionario datos generales

SCHOOL ESCUELA: _____	LAST, FIRST NAME OF CHILD APELLIDO, NOMBRE DEL NIÑO(A): _____, _____	INTERVIEWER ENTREVISTADOR: _____
LAST, FIRST NAME OF TEACHER APELLIDO, NOMBRE DEL MAESTRO(A): _____, _____	LAST, FIRST NAME OF PARENT/GUARDIAN APELLIDO, NOMBRE DEL PADRE O ENCARGADO: _____, _____	COMMUNITY WHERE THE CHILD LIVE COMUNIDAD DONDE VIVE EL NIÑO: _____
GRADE GRADO: <input type="checkbox"/> 2° <input type="checkbox"/> 3° <input type="checkbox"/> 4°	IDENTIFICATION CODE CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN: <div style="border: 1px dashed black; width: 100px; height: 20px; margin: 5px 0;"></div>	DATE OF INTERVIEW (dd/mm/yyyy) FECHA DE ENTREVISTA (dd/mm/aaaa): /__ / 2015

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

A	Obtained parent/ guardian consent? ¿Se obtuvo consentimiento de sus padres o encargados?	<input type="checkbox"/> Yes <i>Continue to question B</i> <input type="checkbox"/> Sí <i>Pase a la pregunta B</i>	<input type="checkbox"/> No <i>Exclude participation</i> <input type="checkbox"/> No <i>Excluya su participación</i>
B	Obtained child assent? ¿Se obtuvo el asentimiento del niño?	<input type="checkbox"/> Yes <i>Continue to question C</i> <input type="checkbox"/> Sí <i>Pase a la pregunta C</i>	<input type="checkbox"/> No <i>Exclude participation</i> <input type="checkbox"/> No <i>Excluya su participación</i>
C	Is the child ≥ 6 years of age ¿Es el niño ≥ 6 años de edad?	<input type="checkbox"/> Yes <i>Continue to question 1</i> <input type="checkbox"/> Sí <i>Pase a la pregunta 1</i>	<input type="checkbox"/> No <i>Exclude participation</i> <input type="checkbox"/> No <i>Excluya su participación</i>

INFORMACIÓN BÁSICA

1	Child's sex / Sexo	<input type="checkbox"/> Male / Masculino (1)	<input type="checkbox"/> Female / Femenino (0)
2	Child's birthday (dd/mm/yyyy) / Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)	_____/_____/_____	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe Age / Edad:
3	Does the child have dirty finger nails? ¿El niño(a) tiene las uñas sucias?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)
4	Is the child wearing shoes/sandals? ¿El niño lleva puestos zapatos o sandalias?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)

NIVEL DE CONOCIMIENTO SOBRE LOS PARÁSITOS

5	Do you know what (parasitic) worms are? ¿Sabes qué son las lombrices intestinales?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)
6	Have you ever had worms? ¿Has tenido alguna vez lombrices intestinales?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0) <input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
7	If yes, how do you know? Did you pass them in your stools? Or did you have a lab exam done? ¿Cómo sabes? ¿Te salieron con el pupú o te hicieron examen?	<input type="checkbox"/> Passed them in stool / Salieron en el pupú (1)	<input type="checkbox"/> Lab exam / Examen de laboratorio (2) <input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)

HOUSEHOLD CHARACTERISTICS

CARACTERÍSTICAS DE LA VIVIENDA

8	Type of floor in the kitchen (mark all that apply) Tipo de piso en la cocina (marque todas las que apliquen)	<input type="checkbox"/> Earthen / Tierra (1)	<input type="checkbox"/> Cement / Cemento (2)	<input type="checkbox"/> Tile / Ladrillo o cerámica (3)	<input type="checkbox"/> Other / Otro _____ (4)
9	Type of floor in the living room (mark all that apply) Tipo de piso en la sala (marque todas las que apliquen)	<input type="checkbox"/> Earthen / Tierra (1)	<input type="checkbox"/> Cement / Cemento (2)	<input type="checkbox"/> Tile / Ladrillo o cerámica (3)	<input type="checkbox"/> Other / Otro _____ (4)
10	Type of floor in the bedroom (mark all that apply) Tipo de piso en el dormitorio (marque todas las que apliquen)	<input type="checkbox"/> Earthen / Tierra (1)	<input type="checkbox"/> Cement / Cemento (2)	<input type="checkbox"/> Tile / Ladrillo o cerámica (3)	<input type="checkbox"/> Other / Otro _____ (4)
11	How many people live permanently in your house? ¿Cuántas personas viven permanentemente en su casa?	Number of people ____ Total _____	Adults >16 ____ Adultos >16__	Children <16 ____ Niños <16__	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
12	How many rooms are used as bedrooms? ¿Cuántos cuartos en la casa son usados como dormitorio exclusivamente?	Number of bedrooms _____ Número de dormitorios _____			<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
13	Is there a school-age child no attending school? ¿Hay algún niño en edad escolar que no esté yendo a la escuela? (6-14 años)	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)
14	Does your house have ¿Tienes en tu casa:	A - Electrical energy? Energía eléctrica?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
		B - A radio? Radio?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
		C- A television? Televisor?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
		D- A refrigerator? Refrigerador?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
		E- A house phone? Teléfono fijo?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
		F- A cell phone? Teléfono celular?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)

15	Do you have piped water in your house? ¿Tienes agua de la llave en tu casa?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	
16	Do you have any latrine or flushable toilet available at your house? ¿Tienes letrina o servicio sanitario en tu casa?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	
17	A. Does your family own dogs? ¿Tienen perros en tu casa?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	How many? ¿Cuántos? _____
	B. <input type="checkbox"/> Stray even partially or all the time / Deambulando libres por la calle (1)	<input type="checkbox"/> Enclosed all the time / Encerrados todo el tiempo (0)			
18	A. Does your family own pigs? ¿Tienen cerdos en tu casa?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	
	B. <input type="checkbox"/> Stray even partially or all the time / Deambulando libres por la calle (1)	<input type="checkbox"/> Enclosed all the time / Encerrados todo el tiempo (0)			

**ACTIVITIES
ACTIVIDADES**

19	Do you defecate in the open? ¿Haces pupú en la tierra o patio?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
20	Do you go outside without shoes on? ¿Caminas descalzo(a)?	<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)

**HISTORY OF DEWORMING
HISTORIA DE DESPARASITACIÓN**

21	A. Have you ever received deworming treatment? ¿Te han dado tratamiento para las lombrices alguna vez?		<input type="checkbox"/> Yes / Sí (1)	<input type="checkbox"/> No / No (0)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)	
	B. Type of treatment / Tipo de tratamiento	<input type="checkbox"/> Tablets / Pastillas (1)	<input type="checkbox"/> Syrup / Jarabe (2)	<input type="checkbox"/> Herbs / Yerbas (3)	<input type="checkbox"/> Other / Otro _____(4)	<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)
	C. If yes, when was the last time you were dewormed? ¿En caso que sí, cuándo fue la última vez que te dieron ese tratamiento?		_____ months ago / meses	<input type="checkbox"/> Over a year ago / Hace más de un año (0)		<input type="checkbox"/> Don't know / No sabe (99)

Comments / Comentarios: _____

Checked for completeness / Verificó que estaba completo: _____

Date (dd-mm-yyyy) / fecha (dd-mm-aaaa):

/ ___ / 2015

THANK YOU FOR PARTICIPATING! ¡GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!

Anexo 4. Cuestionario síntomas alérgicos

Fecha de la entrevista: _____ 2015. Lugar _____

Entrevistador (a): _____

Persona que responde la entrevista: _____ Relación con el niño: _____

Nombre completo del niño(a) _____

Fecha de nacimiento _____ Sexo _____ Grado _____ Escuela _____

		Nunca	A veces	Muchas veces
1	¿Cuándo el niño(a) corre o realiza algún ejercicio fuerte, tose mucho, se ahoga o le cuesta respirar?			
2	¿El niño(a) se despierta por las noches tosiendo (aunque no esté resfriado)?			
3	¿El niño(a) se queja de dolor (opresión) en el pecho sin estar enfermo de otra cosa?			
4	¿Cuándo el niño(a) tose, se le escucha un silbido en el pecho?			
5	¿El niño(a) presenta estornudadera cuando no tiene catarro o gripe?			
6	¿El niño(a) presenta mocos o se le tapa la nariz (aunque no tenga gripe)?			
7	¿El niño(a) se queja de picazón en la nariz?			
7	Al niño(a) le pican los ojos se le ponen llorosos (aunque no tenga gripe)?			
8	¿Cuándo el clima se pone frío, el niño(a) presenta algunos de los síntomas anteriormente descritos?			
9	¿Cuándo el niño(a) está cerca de perros o gatos estornuda, tose o le pican los ojos?			
10	¿El niño(a) presenta salpullido o ronchas en la piel? En qué casos:			

		SI	NO
11	¿Le ha dicho un doctor o enfermera que su hijo(a) padece de alergia o asma? Explique:		
12	¿Toma el niño(a) algún medicamento para la alergia o asma?		
13	¿Ha presentado el niño(a) alguna reacción alérgica exagerada cuando lo pica algún insecto? (ronchas, inflamación, enrojecimiento fuerte, etc.)?		
14	¿Hay alguna comida o bebida (leche, por ejemplo) que le cause alergia alrededor de la boca, cara, piel o que le cause dificultad para respirar? ¿Qué alimento o bebida?		

	¿Hay alguna comida o bebida (leche, por ejemplo) que le cause diarrea al niño? ¿Qué alimento o bebida?		
15	¿Es el niño(a) alérgico(a) a algún medicamento? ¿A cuál?		
16	¿Sabe si la mama, el papa o algún hermano del niño tiene problemas de alergia? ¿Quién?		
17	¿Fuma alguien dentro de la casa?		
18	¿Tiene el niño contacto con perros? (en la casa o ajenos)		
19	¿Tiene el niño contacto con gatos? (en la casa o ajenos)		
20	¿Duerme el niño con algún peluche o muñeco de tela?		
21	¿Ha tenido el niño(a) piojos en los últimos 12 meses?		
22	¿Qué tipo de estufa tiene en su casa? a. Eléctrica <input type="checkbox"/> b. Gas <input type="checkbox"/> c. Kerosene <input type="checkbox"/> d. Leña <input type="checkbox"/>		
23	¿Hace cuánto el niño vive en esta comunidad? a. < 6 meses <input type="checkbox"/> b. Entre 6 meses pero menos de un año <input type="checkbox"/> c. >1 año <input type="checkbox"/> c. Siempre ha vivido aquí <input type="checkbox"/>		

Anexo 5. Instrucciones toma de muestra

<p>1. Deposite las heces sobre un papel periódico.</p> <p>2. La toma de muestra la hará temprano en la mañana. No deposite las heces sobre el suelo</p> <p>3. Evitar que las heces se mezclen con orina, puede orinar antes en la letrina o servicio sanitario y luego hacer su deposición en el periódico.</p>	
<p>4. Coloque los guantes en sus manos con cuidado de no romperlos</p>	
<p>5. Con las espátulas de madera, tome una porción de heces</p> <p>6. Coloque la muestra en el frasco plástico transparente que tiene su nombre</p> <p>7. Llene el frasco hasta la mitad con la muestra y tápelo bien</p> <p>8. Descarte las espátulas de madera en el basurero</p>	
<p>9. Ponga el frasco con la muestra dentro de la bolsita plástica transparente y haga un nudo</p>	
<p>10. Coloque esta bolsita plástica cerrada con el frasco de la muestra, dentro de la bolsa de papel manila.</p>	
<p>11. Bote los guantes en el basurero</p>	
<p>12. Lave sus manos con agua y jabón</p>	
<p>13. Lleve cuanto antes esta muestra al sitio que se le haya designado</p>	

Gracias por su cooperación

Anexo 6. POE toma de muestra sanguínea

Procedimiento operativo estándar para la recolección de muestras sanguíneas mediante punción venosa con Vacutainer®

1. **Objetivo:** establecer el procedimiento para acceder al torrente sanguíneo, mediante punción, con el fin de extraer una muestra de sangre utilizando una técnica segura y que evite contaminación como es la técnica de vacutainer.
2. **Alcance:** será aplicado en la toma de muestras sanguíneas en el trabajo de investigación de campo.
3. **Responsables:** la venopunción será ejecutada por personal del equipo de investigación entrenada y con experiencia en técnicas de flebotomía.

4. **Definiciones:**

La recolección de sangre es una técnica médica utilizada con mucha frecuencia. El paciente en ocasiones se muestra ansioso, temeroso y es por eso importante que el encargado de la toma de muestra trate al paciente con amabilidad y comprensión.

La finalidad es acceder al torrente sanguíneo, mediante punción, con el fin de extraer una muestra de sangre para evaluación de valores hematológicos como la hemoglobina, hematocrito, conteo de células sanguíneas blancas y plaquetas; y para obtención de suero para el análisis de IgE, IgG para *Strongyloides* y *Toxocara*

5. **Siglas:**

EDTA: sales de sodio o potasio de ácido etilendiaminotetracético

6. **Procedimiento:**

1. Asegúrese de la correcta identificación del paciente
2. Observar las condiciones físicas y psicológicas del paciente, si está muy ansioso tratar de calmarlo
3. Sentarlo en una silla con un soporte firme para que el brazo este fácilmente accesible para el flebotomista
4. Tener disponible todo el material necesario
5. Considerar un tiempo adecuado para explicar el procedimiento
6. Verificar que el sitio de punción esté libre de daños y este lejos de algún foco de infección
7. Con las manos previamente lavadas colocar los guantes
8. Colocar el torniquete entre 7.5 y 10 cm por encima del sitio de punción.

9. La tensión deberá ser suficiente para que ponga las venas prominentes pero que no comprometa la circulación
 10. Pedirle al paciente que cierre la mano
 11. Seleccionar la vena por palpación cuidadosamente
 12. Desinfectar la zona elegida con una torunda de algodón impregnándola con alcohol etílico al 70%.
 13. Dejar secar el alcohol antes de puncionar
 14. No volver a tocar el sitio desinfectado
 15. Romper el sello de la funda de la aguja en insértela con un giro en la camisa hasta el tope
 16. Inmovilice la vena colocando el pulgar debajo de la zona de punción y tense la piel
 17. Con el bisel de la aguja hacia arriba en un ángulo de 15° puncione rápidamente.
 18. Inserte el tubo en la aguja del interior de la camisa y espere que el tubo se llene completamente de sangre. Una vez lleno, suelte el tubo y coloque el siguiente tubo de la misma forma
 19. El torniquete debe ser quitado en el momento en el que la sangre empieza a entrar al tubo
 20. Una vez llenos todos los tubos, retirar la aguja con cuidado y colocar un algodón seco sobre la punción y mantener presionado hasta que deje de sangrar
 21. Coloque los tubos en la gradilla
 22. Retire todo el material
 23. Descarte de la manera correcta
7. Muestra requerida: sangre venosa
 8. Reactivos: EDTA
 9. Materiales:
 1. Alcohol 70%
 2. Gasa seca o algodón
 3. Torniquete

4. Tubos con y sin anticoagulante
 5. Soporte vacutainer (camisa)
 6. Curitas redondas
 7. Aguja estéril vacutainer calibre 21
 8. Marcador indeleble punta fina
10. Condiciones de bioseguridad
1. Tener el entrenamiento para la venopunción
 2. Toda muestra debe considerarse potencialmente infecciosa
 3. Lavarse las manos antes y después de cada procedimiento
 4. Usar equipo de protección personal
 5. Tener recipiente de paredes rígidas para descarte de punzocortantes
11. Referencias
- Manual de técnicas básicas para el diagnóstico de las parasitosis intestinales.
UNICEF
- Manual de Bioseguridad en el laboratorio. OMS, 2005

Anexo 7. POE examen directo de heces

Procedimiento Operativo Estándar para la ejecución del examen directo de heces

1. **Objetivo:** identificación de huevos y larvas de helmintos, quistes y trofozoítos de protozoos en heces frescas.
2. **Alcance:** será aplicado en todas las muestras de heces que se recolecten en la investigación
3. **Responsables:** este procedimiento será llevado a cabo por todos los miembros del equipo de trabajo que tienen la capacitación necesaria para realizar este procedimiento
4. **Definiciones:**

La técnica presenta dos tipos de preparaciones, una en solución salina que tiene como finalidad la identificación de huevos y larvas de helmintos y la identificación del movimiento de algunos protozoos; y una solución de yodo que sirve como colorante temporal para la identificación de quistes y trofozoítos de protozoos.

5. **Siglas:**

SS: solución salina

6. **Muestra requerida:** heces
7. **Reactivos:** solución salina y tintura de yodo
8. **Materiales**
 1. Portaobjetos
 2. Cubreobjetos
 3. Aplicadores de madera
 4. Pana para descarte
9. **Procedimiento:**

1. Con un lápiz graso o un rotulador, escríbase el nombre del paciente (o el número de identificación) y la fecha en el extremo izquierdo del portaobjetos.
2. Depótese una gota de suero salino en el centro de la mitad izquierda del portaobjetos y una gota de solución yodada en el centro de la mitad derecha.
3. Con un aplicador (palillo o fósforo) , tómese una pequeña porción de heces (del tamaño de la cabeza del fósforo, es decir, unos 2 mg) y depótese en la gota de suero salino; añádase una porción análoga a la gota de solución yodada Mézclense las heces con cada gota para obtener sendas suspensiones.

4. Colóquese un cubreobjetos sobre cada gota, apoyándolo primero en ángulo sobre el borde de la misma y bajándolo luego con cuidado a fin de que no queden burbujas entre el cubreobjetos y el portaobjetos.
 5. Examínense las preparaciones con el objetivo de 10X (o, si es preciso para la identificación, con objetivos de mayor aumento) de manera sistemática (bien de arriba abajo o de un lado a otro) hasta haber observado toda la zona situada bajo el cubreobjetos. Cuando se encuentren microorganismos u objetos sospechosos, pásese a un mayor aumento para observar con más detalle la morfología del objeto en cuestión.
 6. Descarte los cubreobjetos en la caja de paredes rígidas y los portaobjetos en la pana de descarte para su posterior lavado
 7. Reporte los resultados
10. Condiciones de bioseguridad:
1. Estar debidamente entrenado en el procedimiento
 2. Toda muestra debe tratarse como potencialmente infecciosa
 3. Manejar con cuidado el uso de material de vidrio y su descarte
 4. Los recipientes de descarte deben tener una solución de cloro al 0.5%
11. Referencias

Medios auxiliares para el diagnóstico de parasitosis intestinales. OMS. 1994

Anexo 8. POE Kato-Katz

Procedimiento Operativo Estándar para la ejecución de la técnica de Kato-Katz

1. Objetivo: establecer el procedimiento de la técnica de Kato-Katz
2. Alcance: será aplicado en el laboratorio del lugar del trabajo campo
3. Responsables: la técnica será realizada por el equipo de investigación con entrenamiento en la técnica de Kato-Katz
4. Definiciones

Es una técnica que ha sido ampliamente evaluada y consiste en una modificación volumétrica realizada por Naftale Katz en 1972 del método gravimétrico original de los japoneses Kato y Miura en 1954. Es utilizada para el diagnóstico cuali-cuantitativo de las helmintiasis intestinales, en la cual se aclara con glicerina un frotis grueso de heces no diluidas. Es la técnica promovida por la OMS para estudios de campo.

5. Siglas: HPG: huevos por gramo
6. Muestra requerida: heces
7. Reactivos: solución de glicerina y verde de malaquita
8. Materiales:
 1. Rectángulos de celofán hidrofílico de 40-50 micras de grosor, que mide 25x30 mm
 2. Espátulas plásticas
 3. Templete de plástico con un orificio de 6 mm de diámetro x1.5 mm de grosor
 4. Malla de nylon
 5. Papel periódico
 6. Pinzas
 7. Portaobjetos 3 x 2 pulg.
 8. Marcador indeleble
 9. Paleta de madera
 10. Contador manual
 11. Aplicadores de madera
 12. Recipientes de descarte de material
9. Equipo: microscopio óptico

10. Procedimiento
 1. Extender el papel periódico sobre la mesa de trabajo
 2. Rotular el portaobjetos, colocar el templete sobre el portaobjetos
 3. Con la espátula tomar una cantidad de heces y colocarla sobre la tapadera del frasco de toma de muestra
 4. Colocar sobre este la malla de nylon. Raspar la superficie de la malla con la espátula tomando suficientes heces coladas hasta llenar el agujero del templete
 5. Remover el templete cuidadosamente y que quede el cilindro de heces sobre el portaobjeto
 6. Cubrir el cilindro de heces con el rectángulo de celofán
 7. Invertir el portaobjetos con esta preparación sobre una hoja de papel periódico y hacer presión con el pulgar hasta extender las heces.
 8. Dar vuelta y colocar en una superficie protegida de insectos y esperar de 30 a 45 min
 9. Observar al microscopio con objetivo de 10X. contar de manera sistemática todos los huevos
 10. Calcular los resultados multiplicando el número de huevos contados por el factor que es 24 y reporta el número de HPG
11. Control de calidad: el 10% de las preparaciones serán examinadas por una persona especialista en el área
12. Condiciones de bioseguridad:
 1. Esta técnica debe trabajarse en un laboratorio de nivel de bioseguridad de tipo II, pero puede llevarse a cabo en un nivel más bajo utilizando las medidas adecuadas de protección
 2. Las muestras deben ser descartadas por incineración
 3. El material utilizado debe desecharse en bolsas rojas
 4. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas con cloro al 0.5%
13. Referencias
 1. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. 2005
 2. A simple device for quantitative stool thick/smear technique in Schistosomiasis mansoni. Katz N, Chavez A, Pellegrino J. 1972

Anexo 9. POE Formol-Acetato de Etilo

Procedimiento Operativo Estándar para la ejecución de la técnica Formol-Acetato de Etilo (FAE)

1. Objetivo: establecer el procedimiento de la técnica de formol acetato de etilo
2. Alcance: será aplicado en el laboratorio Teasdale-Corti (UNAH)
3. Responsables: la técnica será realizada por el equipo de investigadores con entrenamiento en la técnica de formol-acetato de etilo
4. Definiciones:

Esta es una técnica de concentración que sirve para el diagnóstico de larvas y huevos de helmintos, además de la búsqueda de quistes y trofozoítos de protozoos.
5. Muestra requerida: heces
6. Reactivos: formalina 10% y acetato de etilo
7. Materiales:
 1. Tubos cónicos de 15 ml
 2. Aplicadores de madera
 3. Gasa
 4. Centrifuga
 5. Portaobjetos
 6. Cubreobjetos
 7. Pipetas de transferencia
 8. Recipientes para descarte de materiales
8. Equipo:
 1. Microscopio óptico
 2. Centrifuga
9. Procedimiento:
 1. Añádanse con un aplicador 1 ,0-1 ,5 g de heces a 10 ml de formol en un tubo de centrifugadora y revuélvase para obtener una suspensión.
 2. Fíltrese la suspensión por un tamiz de dos capas de gasa quirúrgica húmeda, pasándola directamente a otro tubo de centrifugadora o a un pequeño vaso de precipitados. Deséchese la gasa.

3. Añádase más formol al 10% a la suspensión del tubo hasta obtener un volumen total de 10 ml.
 4. Añádanse 3,0 ml de éter (o acetato de etilo o gasolina) a la suspensión y mézclese bien, tapando luego el tubo con un tapón de goma y sacudiéndolo enérgicamente por 10 seg.
 5. Destápese el tubo y colóquese en la centrifugadora; equilíbrense los tubos y centrifúguense 400-500 g durante 2-3 minutos
 6. Retírese el tubo de la centrifugadora. El contenido se habrá separado en cuatro capas: a) una capa superior de éter (o acetato de etilo o gasolina), b) un tapón de residuos grasos que se adhiere a las paredes del tubo, e) una capa de formol, y d) un sedimento.
 7. Sepárese con cuidado el tapón de residuos con un aplicador de madera mediante un movimiento en espiral y viértanse las tres capas superiores de golpe, invirtiendo el tubo para que se vacíe durante cinco segundos por lo menos. Cuando esta maniobra se practica correctamente queda una pequeña cantidad de líquido en las paredes del tubo que refluye hasta el sedimento.
 8. Mézclese el líquido con el sedimento (a veces es necesario añadir una gota de suero salino a fin de obtener suficiente líquido para suspender el sedimento) con una pipeta de vidrio desechable. Transfírase una gota de la suspensión a un portaobjetos para examinarla bajo cubreobjetos; también puede hacerse una preparación teñida con yodo.
 9. Examínense las preparaciones con el objetivo de 10X (o, si es necesario para la identificación, con objetivos de más aumento) de manera sistemática hasta haber observado toda la zona situada bajo el cubreobjetos. Cuando se encuentren microorganismos u objetos sospechosos, pásese a un mayor aumento para observar con más detalle la morfología del objeto en cuestión.
10. Condiciones de bioseguridad
1. Esta técnica debe trabajarse en un laboratorio de nivel de bioseguridad de tipo II, pero puede llevarse a cabo en un nivel más bajo utilizando las medidas adecuadas de protección
 2. Las muestras deben ser descartadas por incineración
 3. El material utilizado debe desecharse en bolsas rojas
 4. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas con cloro al 0.5%
11. Referencias:
1. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. 2005
 2. Medios auxiliares para el diagnóstico de parasitosis intestinales. OMS. 1994

Anexo 10. POE determinación de *Strongyloides stercoralis* IgG

Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de anticuerpos séricos IgG de *Strongyloides stercoralis*

1. Objetivo: determinar anticuerpos IgG de *Strongyloides stercoralis* en suero.
2. Alcance: se realizará en el laboratorio de investigación de la Universidad de Brock, Ontario, Canadá.
3. Responsable: la prueba será realizada por los miembros del equipo de investigación del proyecto.
4. Definición:

Strongiloidiasis es una enfermedad causada por el parásito *Strongyloides stercoralis*. Este organismo es un nematodo intestinal con distribución mundial, pero que se encuentra mayormente en regiones tropicales. Generalmente se presenta con síntomas intestinales, y en algunos casos puede volverse extra intestinal y llevar a choque séptico y meningitis.

Principio de la prueba: los pocillos de la prueba están cubiertos con antígeno de *Strongyloides*. Durante la primera incubación con el suero diluido del paciente, cualquier anticuerpo que reaccione con el antígeno se unirá a los pocillos cubiertos. Después del lavado para remover el resto de la muestra, se agrega el conjugado enzimático. Si los anticuerpos se han unido a los pocillos, entonces el conjugado se unirá a los anticuerpos. Después de otra serie de lavados, se agrega un cromógeno (tetrametilbenzidina, TMB); si el conjugado enzimático está presente, la peroxidasa puede catalizar una reacción que consume el peróxido y vuelve el cromógeno de claro a azul. La reacción termina al agregar la solución de parada que vuelve el color azul a amarillo. La reacción puede leerse visualmente o en un lector de ELISA.

5. Muestra requerida: suero
6. Materiales:
 1. Pipetas de transferencia
 2. Viales tapón de rosca 1.5 mL
 3. Puntas para micropipeta
 4. Descartador de puntas
 5. Marcador indeleble
 6. Pizeta de 500 mL
 7. Kit AccuDiag™ *Strongyloides* IgG ELISA
7. Equipo:
 1. Micropipeta 10-100 µL
 2. Micropipeta 5-10 µL
 3. Centrífuga
 4. Lector ELx-800
 5. Lavador automático ELx50
8. Procedimiento:

Separación del suero:

 1. Centrifugar la muestra por 5 min a 3000 rpm
 2. Separar el suero en tres viales con tapón de rosca de 1.5 mL, colocando 300 µL en cada uno.
 3. Congelar a -20°C hasta su uso

Preparación inicial de las muestras y reactivos:

1. Antes de usar, llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (15-25°C) y mezclar.
2. Asegurar que el concentrado de lavado (20X) está en solución antes de diluirlo a la concentración de trabajo. Para diluir el concentrado de lavado (20X), remueva el tapón y agregue el contenido a una pizeta conteniendo 475mL de agua destilada. Agitar para mezclar.

Procedimiento del ensayo:

1. Tomar el número de pocillos que necesita (dos para los controles más el número de muestras dobles) y colocarlas en el sostén de tiras.
2. Diluir el suero del paciente 1:64 con el buffer de dilución (5 µL de suero y 315 µL de buffer de dilución). Agregar 100 µL del control negativo al pocillo #1, 100 µL del control positivo al pocillo #2 y 100 µL de las muestras diluidas a los pocillos restantes.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, luego lavar (cinco veces). Después del último lavado, sacuda los pocillos sobre una toalla absorbente para remover el exceso de buffer de lavado.
4. Agregue 100 µL del conjugado enzimático a cada pocillo.
5. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, después lavar (5 veces). Después del último lavado, sacuda los pocillos sobre una toalla absorbente para remover el exceso de buffer de lavado.
6. Agregue 100 µL del cromógeno a cada pocillo.
7. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
8. Agregue 100 µL de la solución de parada a cada pocillo. Mezcle suavemente por 15 segundos. Leer a 450/620-650 nm.
9. Interpretación de los resultados:
 - Resultado positivo: absorbancia mayor o igual a 0.2
 - Resultado negativo: absorbancia menor a 0.2.
 - Una lectura positiva indica que el paciente podría estar infectado con *Strongyloides*.
 - Una lectura negativa indica que el paciente no tiene niveles detectables del anticuerpo. Esto puede ser por la falta de la infección o una pobre respuesta inmune.

10. Medios de control:

1. El uso de controles permite validar la estabilidad del kit.
2. Valores esperados:
 - Negativo: absorbancia de 0.0 a 0.2
 - Positivo: absorbancia mayor a 0.5

11. Restricciones:

1. No cambiar ninguno de los procedimientos indicados.
2. No intercambiar reactivos entre kits con número de lote diferente
3. No usar reactivos después de su fecha de expiración.
4. No usar las soluciones si tienen precipitado o no están claras. A excepción de la solución de lavado.
5. No usar sueros lipémicos. Estos deben ser clarificados.

12. Medidas de bioseguridad:

1. Toda muestra debe considerarse potencialmente infecciosa.
2. Algunos reactivos pueden irritar la piel y ojos. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
3. Se tomarán las medidas estipuladas en el manual de bioseguridad de la OMS para la toma, separación, almacenaje y traslado de la muestra.
4. Se seguirán las medidas de bioseguridad exigidas por el laboratorio de investigación de la Universidad de Brock

13. Referencias:

1. Inseto AccuDiag™ *Strongyloides* IgG ELISA Kit. Inmuno Diagnostics
2. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. Tercera edición. 2015

Anexo 11. POE determinación de IgE

Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de IgE en el sistema Bio-Plex®

1. Objetivo: determinar los niveles de IgE total en suero.
2. Alcance: se realizará en el laboratorio de investigación de la Universidad de Brock, Ontario, Canadá
3. Responsable: la prueba será realizada por los miembros del equipo de investigación del proyecto.
4. Definición:

Tecnología:

El Sistema de matriz de suspensión Bio-Plex® está compuesto de tres elementos principales de la tecnología xMAP:

1. Micro esferas fluorescentemente teñidas (también llamadas perlas), cada uno con un código de color distinto o dirección espectral para permitir la discriminación de las pruebas individuales dentro de una suspensión múltiplex. Esto permite la detección simultánea de más de 100 tipos diferentes de moléculas en un solo pocillo de una microplaca de 96 pocillos.
2. Un citómetro de flujo con dos láseres y una óptica asociada para medir las diferentes moléculas unidas a la superficie de las perlas. El Bio-Plex MAGPIX™ utiliza la tecnología LCD y CCD para realizar la misma.
3. Un procesador de señal de alta velocidad que maneja eficientemente los datos de fluorescencia

Formato del ensayo:

Es un inmunoensayo que se lleva cabo con perlas magnéticas. El principio del ensayo es similar al de una ELISA tipo sándwich (Figura1). Los anticuerpos de captura dirigidos contra la IgE se unen covalentemente a las perlas magnéticas. Estas reaccionan con la muestra que contiene la IgE. Después de una serie de lavados para remover las proteínas que no se unieron, un anticuerpo de detección biotinilado se agrega para crear un complejo tipo sándwich. La detección final del complejo se da con la adición del conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). La ficoeritrina sirve como un indicador de fluorescencia.

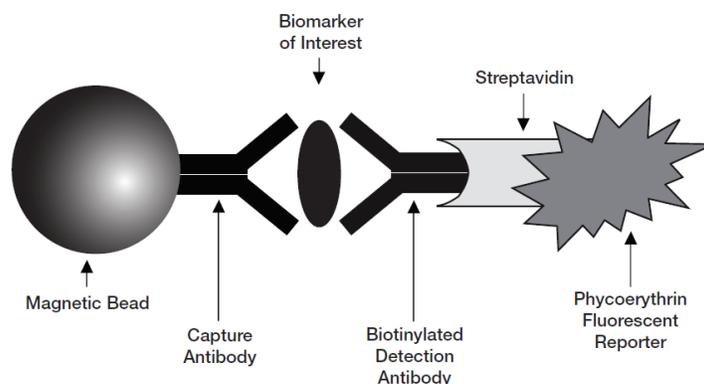


Figura1. Complejo sándwich Bio-Plex®

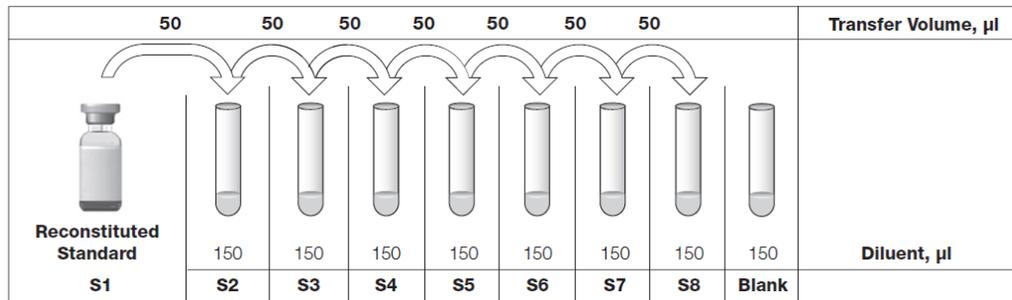
4. Muestra requerida: suero
5. Materiales:
 1. Viales tapón de rosca 1.5 mL
 2. Puntas para micropipeta 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-100 μ L
 3. Descartador de puntas
 4. Marcador indeleble
 5. Papel aluminio
 6. Gradillas para viales 1.5 mL
6. Equipo:
 1. Micropipeta 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L
 2. Micropipeta multicanal 20-300 μ L
 3. Vortex
 4. Luminex
 5. Centrifuga
 6. Magneto
7. Procedimiento:

Separación del suero:

 1. Centrifugar la muestra por 5 min 3000 rpm
 2. Separar el suero en tres viales con tapón de rosca de 1.5 mL, colocando 300 μ L en cada uno.
 3. Congelar a -20°C hasta su uso

Preparación inicial:

 1. Planificar la disposición de la placa
 2. Encienda el Sistema Magpix® (30 minutos)
 1. Llevar el buffer de lavado, buffer de ensayo y el diluyente de isotipificación a temperatura ambiente (TA). Mantenga los demás componentes en hielo hasta que se necesiten.
 2. Comenzar a descongelar las muestras.
 3. Primero prepare la estación de lavado.
 4. Calibre el sistema Bio-Plex siguiendo las indicaciones del software. (esto puede realizarse durante algún tiempo de incubación)
 5. Prepare el buffer de lavado 1X. Mezcle la solución 10X por inversión para asegurar que todas las sales están en solución. Luego diluya una parte con 9 partes de agua destilada.
 6. Reconstituya el vial de los estándares en 781 μ L del diluyente de isotipificación (Isotyping diluent). Reconstituya el vial de los controles de calidad en 250 μ L del mismo diluyente. Mezclar en vortex por 5 segundos e incubar todos los viales en hielo por 30 minutos.
 7. Prepare diluciones cuádruples del estándar y el blanco. Mezcle en vortex por 5 segundos entre cada transferencia de líquidos.



- Una vez descongeladas las muestras, realizar una dilución 1:500 con el diluyente de isotipificación.
- Mezcle en vortex las perlas magnéticas por 30 segundos y diluya 1X en el buffer de ensayo (Bio-Plex assay buffer). Proteja de la luz.

# of Wells	20x Beads, µl	Assay Buffer, µl	Total Volume, µl
96	288	5,472	5,760

Corrida del ensayo:

- Mezcle las perlas diluidas. Agregue 50 µL a cada pocillo.
- Lave dos veces con 100 µL de la solución de lavado. Recuerde utilizar el magneto cada vez que descarte la solución de lavado para evitar descartar las perlas magnéticas. (Este proceso se realizará en cada lavado)
- Mezcle las muestras, estándar, blanco y controles. Agregue 50 µL a cada pocillo.
- Cubra la placa y proteja de la luz con papel aluminio. Incube en agitador a 850 ± 50 rpm a temperatura ambiente por una hora.
- 10 minutos antes de terminar la incubación, mezcle los anticuerpos de detección por 5 segundos y realice un spin rápido para colectar el líquido. Diluya 1X.

# of Wells	20x Detection Ab, µl	Detection Ab Diluent, µl	Total Volume, µl
96	150	2,850	3,000

- Lave la placa tres veces con 100 µL con buffer de lavado.
- Mezcle los anticuerpos de detección diluidos 1X. agregue 25 µL a cada pocillo.
- Cubra e incube a 850 ± 50 rpm, en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras, prepare el protocolo en el software; ingrese primero los valores del estándar S1 y las unidades provistas en el kit.
- 10 minutos antes de terminar el tiempo de incubación, mezcle la streptavidin-PE (SA-PE) 100X por 5 segundos y agite rápido para colectar el líquido. Diluya 1X.

# of Wells	100x SA-PE, µl	Assay Buffer, µl	Total Volume, µl
96	60	5,940	6,000

- Lave la placa tres veces con 100 µL de buffer de lavado.
- Mezclar en vortex la SA-PE 1X. agregue 50 µL a cada pocillo.
- Cubra e incube a 850 ± 50 rpm, en oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente.

13. Lave la placa tres veces con 100 μ L de solución de lavado.
14. Resuspenda las perlas en 125 μ L de buffer de ensayo. Cubra y agite a 850 ± 50 rpm por 30 segundos.
15. Remueva el cobertor y lea la placa en el MAGPIX.
16. Si utilizó controles, compare los resultados observados contra los rangos provistos por el kit.
17. Medios de control:
El kit provee un control con valores conocidos (este puede variar en cada kit), revisar e ingresar el dato al momento de configurar el software para la corrida.
Una vez obtenida la lectura, comparar con los datos que provee el kit.
18. Restricciones:
 1. Los reactivos deben permanecer en refrigeración.
 2. Evitar el congelamiento y descongelamiento de las muestras
 3. No usar reactivos después de su fecha de expiración
19. Condiciones de bioseguridad:
 1. Toda muestra debe considerarse potencialmente infecciosa.
 2. Se tomarán las medidas estipuladas en el manual de bioseguridad de la OMS para la toma, separación, almacenaje y traslado de la muestra.
 3. Se seguirán las medidas de bioseguridad exigidas por el laboratorio de investigación de la Universidad de Brock
20. Referencias
 1. Bio-Plex Pro™ Human Isotyping Assays Instruction Manual
 2. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. Tercera edición. 2015

Anexo 12. Aprobación CEI-MEIZ



UNAH

FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 01-2015

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Título del proyecto: "Perfil inmunológico y epidemiológico de las parasitosis intestinales en escolares hondureños: estudio comparativo entre una población escolar rural y otra urbana durante el periodo comprendido entre agosto del 2015 a junio del 2016"

Equipo de Investigación: Maritza Canales (Investigadora principal), Ana Lourdes Sánchez (Co-investigadora principal), María Mercedes Rueda (Co-investigadora), Carol Anahelka Rodríguez (Co-investigadora), José Antonio Gabrie (Co-investigador) y Joel Saamir García (Co-investigador).

Institución (es): Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología – UNAH y Department of Health Science, Brock University.

Fecha de presentación al comité: 27 / 03 / 2015

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: **01 / 08 / 2015** al **31 / 07 / 2016**

Para los fines de los interesados se les extiende la presenta a los treinta días del mes de julio de 2015.

Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ



Lic. Judith Pulnes Borjas
Secretaria CEI-MEIZ

Anexo 13. Aprobación Brock University



Brock University
Research Ethics Office
Tel: 905-688-5550 ext. 3035
Email: reb@brocku.ca

Bioscience Research Ethics Board

Certificate of Ethics Clearance for Human Participant Research

DATE: 5/8/2015

PRINCIPAL INVESTIGATOR: SANCHEZ, Ana - Health Sciences

CO-INVESTIGATOR(S): Maritza Canales, Maria Mercedes Rueda, and Carol Anahelka Rodriguez

FILE: 14-224 - SANCHEZ

TYPE: Faculty Research STUDENT: Jose Antonio Gabrie (Brock) and Joel Garcia (MB-UNAH)
SUPERVISOR: Ana Sanchez

TITLE: Immunological profile of children with and without soil-transmitted helminth infections: a pilot study in Honduras

ETHICS CLEARANCE GRANTED

Type of Clearance: NEW

Expiry Date: 5/31/2016

The Brock University Bioscience Research Ethics Board has reviewed the above named research proposal and considers the procedures, as described by the applicant, to conform to the University's ethical standards and the Tri-Council Policy Statement. Clearance granted from 5/8/2015 to 5/31/2016.

The Tri-Council Policy Statement requires that ongoing research be monitored by, at a minimum, an annual report. Should your project extend beyond the expiry date, you are required to submit a Renewal form before 5/31/2016. Continued clearance is contingent on timely submission of reports.

To comply with the Tri-Council Policy Statement, you must also submit a final report upon completion of your project. All report forms can be found on the Research Ethics web page at <http://www.brocku.ca/research/policies-and-forms/research-forms>.

In addition, throughout your research, you must report promptly to the REB:

- Changes increasing the risk to the participant(s) and/or affecting significantly the conduct of the study;
- All adverse and/or unanticipated experiences or events that may have real or potential unfavourable implications for participants;
- New information that may adversely affect the safety of the participants or the conduct of the study;
- Any changes in your source of funding or new funding to a previously unfunded project.

We wish you success with your research.

Approved:

Brian Roy, Chair
Bioscience Research Ethics Board

Note: Brock University is accountable for the research carried out in its own jurisdiction or under its auspices and may refuse certain research even though the REB has found it ethically acceptable.

If research participants are in the care of a health facility, at a school, or other institution or community organization, it is the responsibility of the Principal Investigator to ensure that the ethical guidelines and clearance of those facilities or institutions are obtained and filed with the REB prior to the initiation of research at that site.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

FORMULARIO DE BIOSEGURIDAD PROMOCIÓN 2015-2017

Datos Generales	
Nombre de proyecto: Asociación de los helmintos transmitidos por el suelo con el desarrollo de eosinofilia e hiperinmunoglobulinemia E: estudio comparativo entre escolares de un área rural y un área urbana de Honduras. Junio 2015 a agosto 2016	Departamento o unidad ejecutora: MEIZ
Alumno (s) responsable de la investigación: Carol Anahelka Rodríguez, MQC	Asesor (s) responsable: Ana Lourdes Sánchez, PhD
Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: Laboratorio 8, Escuela de Microbiología Laboratorio clínico, Hospital Tela Complejo de laboratorios, Clarins Brock University, Ontario, Canadá	Instituciones participantes: MEIZ Brock University
Naturaleza de la Investigación	
Nombre de los agentes infecciosos que manipulará: <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Trichuris trichiura</i> Ancylostomatídeos Toda muestra biológica se considera potencialmente infecciosa por lo que deberán tratarse como si lo estuvieran	¿En qué nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará? 1 2 3 4 <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación? 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/>

<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los agentes que manipulará?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	
<p>¿Utilizará reactivos químicos?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</p> <p>Lugol</p> <p>Glicerina</p> <p>Verde de malaquita</p> <p>Formalina</p> <p>Acetato de etilo</p> <p>Kit BioPlex Isotyping IgE</p> <p>Kit ELISA <i>Toxocara</i> IgG</p> <p>Kit ELISA <i>Strongyloides</i> IgG</p>	<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Revisar las MSDS de cada reactivo y comentar su riesgo potencial y las medidas básicas de seguridad si es necesario</p>
<p>¿En qué estado manipulará el o los agentes infecciosos?</p> <p>Cultivos puros en placa <input type="checkbox"/> Cultivos en tubo <input type="checkbox"/></p> <p>ADN <input type="checkbox"/> Cultivo de tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Otros <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>No Aplica</p>	
<p>Tipo de muestras que manipulará</p> <p>Tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Sangre <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Orina <input type="checkbox"/></p> <p>Animales <input type="checkbox"/></p>	<p>Heces <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Otros líquidos biológicos <input type="checkbox"/></p> <p>Muestras ambientales* <input type="checkbox"/></p> <p>Cultivos puros <input type="checkbox"/></p> <p>Otras _____</p> <p>*Tipo de muestras ambientales</p>

Describe las técnicas que utilizará

Heces:

Kato katz

Formol acetato de etilo

Examen en fresco

Sangre:

Conteo de eosinofilos (Sistema ABX Pentra. Contratación de laboratorio externo)

Determinación de IgE, BioPlex Isotyping (Sistema MagPix)

ELISA: *Strongyloides* IgG

CONTROLES PRIMARIOS

Controles de Ingeniería

<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química?</p> <p>Si <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?</p> <p>No es necesario el uso de esta, ya que las sustancias utilizadas no causan daño.</p>	<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?</p>
---	---

Equipo de Protección Personal (EPP)

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha Guantes Cabina de bioseguridad

Mascarilla quirúrgica Mascarilla N95 Lentes

Procedimientos Operativos Estándar (POE)

¿Cuenta con los POE's siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras	X		
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	X		

3.- Transporte de muestras	X		
4.- Uso de la CSB			X
5.- Almacenamiento de muestras			X
6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		
8.-Otro:			
Controles Administrativos			
	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?			X
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso del autoclave?			X
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?			X
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, quien tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La presentación de este formulario es requisito obligatorio antes de la aprobación del protocolo de investigación (Seminario de Tesis II).**

Para uso exclusivo de la MEIZ. UNAH

Fecha de presentación (dd/mm/aaaa)	Nombre y firma de quien revisó	Observaciones

Revisión 2015.MC/LE