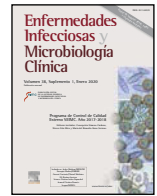


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales

Elena Dacal, Pamela C. Köster y David Carmena*



Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
Diagnóstico molecular
Diagnóstico sintomático
Helminths
Parásitos entéricos
PCR
Protozoos

Las infecciones causadas por parásitos del tracto digestivo humano representan un problema de salud pública global. En países industrializados, sus particulares características epidemiológicas (baja prevalencia general de enteroparásitos), económicas (elevados costes laborales) y clínicas (incremento constante del número de muestras y determinaciones diagnósticas a realizar) han causado que las técnicas moleculares estén progresivamente reemplazando a la microscopía convencional como método de diagnóstico de primera línea de estos patógenos en el laboratorio clínico moderno. Los métodos basados en PCR, particularmente los desarrollados para la detección simultánea de varios agentes que causan la misma etiología (diagnóstico sintomático), representan ya una opción coste-efectiva que permite automatizar procesos, optimizar flujos de trabajo, comparar resultados entre diferentes laboratorios y facilitar la acreditación de procedimientos diagnósticos. En esta revisión se detalla de forma clara y concisa el estado actual del diagnóstico molecular de las principales especies de parásitos intestinales humanos, particularmente de los protozoos entéricos causantes de diarrea (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*), de los miembros más destacados de los filos Microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) y Stramenopiles (*Blastocystis* sp.), así como de los helmintos transmitidos por suelo (*Ancylostoma* spp., *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* y *Trichuris trichiura*) y alimentos (*Anisakis* spp., *Clonorchis sinensis*, *Fasciola* spp., *Taenia solium*, y *Trichinella spiralis*). Especial atención se ha prestado a la descripción de técnicas y formatos disponibles, a sus prestaciones diagnósticas y a los marcadores genéticos más usados, tanto para la detección en laboratorios clínicos como para el genotipado en centros de referencia e investigación.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Molecular diagnosis of intestinal parasitoses

ABSTRACT

Keywords:
Molecular diagnosis
Syndromic diagnosis
Helminths
Enteric parasites
PCR
Protozoans

Infections caused by parasites of the gastrointestinal tract are a global public health problem. In industrialised countries, their particular epidemiological (low general prevalence of enteroparasites), economic (high labour costs) and clinical characteristics (constant increase in the number of samples and diagnostic determinations to be performed) have led molecular techniques to progressively replace conventional microscopy as the first-line diagnostic method of these pathogens in modern clinical laboratories. PCR-based techniques, particularly those developed for the simultaneous detection of the various agents that can cause the same infectious disease (syndromic diagnosis), already represent a cost-effective option that allow process automation, workflow optimisation, and comparison of results among different laboratories, and facilitate accreditation of diagnostic procedures. This review clearly and concisely discusses the current situation of the molecular diagnosis of the main species of intestinal parasites in humans, particularly the enteric protozoans causing diarrhoea (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*), the most important members of the Microsporidia phylum (*Enterocytozoon bieneusi*) and Stramenopiles phylum (*Blastocystis* sp.), as well as the helminths transmitted by soil (*Ancylostoma* spp., *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Trichuris trichiura*) and food (*Anisakis* spp., *Clonorchis sinensis*, *Fasciola* spp., *Taenia solium*, and *Trichinella spiralis*).

*Autor para correspondencia.
Correo electrónico: dacarmena@isci.es (D. Carmena).

tor americanus, *Strongyloides stercoralis* and *Trichuris trichiura*) and food (*Anisakis* spp., *Clonorchis sinensis*, *Fasciola* spp., *Taenia solium*, and *Trichinella spiralis*). Special attention is paid to the description of available techniques and formats, to their diagnostic benefits and the most widely used genetic markers for their detection, both in clinical laboratories and genotyping in referral and research centres.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Parásitos intestinales y salud humana

Las infecciones por parásitos intestinales suponen un importante problema de salud pública global^{1,2}. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* se consideran los agentes causantes de diarrea de origen protozoario más relevantes en todo el mundo, con tasas de morbilidad considerables asociadas principalmente a poblaciones pediátricas en áreas desfavorecidas con pobres condiciones higienicosanitarias¹. Estas 3 especies representan el 70% de las muestras positivas a cualquier parásito intestinal diagnosticadas en hospitales europeos anualmente³. Además, *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. son causa frecuente de brotes de enfermedad gastrointestinal de transmisión hídrica⁴. Por su parte, *Enterocytozoon bieneusi* y, en menor medida, *Enterocytozoon intestinalis*, son los microsporidios que más comúnmente infectan a los humanos, principalmente (pero no exclusivamente) individuos inmunocomprometidos y pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido⁵. Otros protistas frecuentes en el tracto intestinal humano, pero de patogenicidad incierta, son *Dientamoeba fragilis* y *Blastocystis* sp.^{6,7}.

Por otra parte, se estima que 1 de cada 6 personas en el mundo está infectada por alguna especie de geohelminto incluyendo *Ancylostoma* spp., *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* o *Strongyloides stercoralis*⁸. En casos graves estos patógenos están asociados a retrasos en el desarrollo físico y cognitivo de niños infectados, son causa de mala absorción de nutrientes, anemia y obstrucción de las vías intestinales y biliares, lo que perjudica la calidad de vida de los afectados⁹.

Entre los helmintos transmitidos por alimentos destacan la anisakiasis y la triquinosis producidas, respectivamente, por los nematodos *Anisakis* spp. y *Trichinella* spp., así como las taeniasis causadas por los cestodos *Taenia solium* y *Taenia saginata*. En todos ellos, la infección es adquirida por el consumo de carne o pescado crudo, ahumado o insuficientemente cocinado, que contiene los estadios larvarios de estos parásitos y causa trastornos intestinales (diarrea, dolor abdominal) y extraintestinales, principalmente reacciones alérgicas¹⁰⁻¹². También de importancia creciente son los trematodos *Clonorchis sinensis*, *Fasciola* spp. y *Opisthorchis* spp., que afectan primariamente a órganos internos (hígado y pulmón) de los individuos parasitados, causando problemas gastrointestinales, reacciones tóxicas y alergias. La opistorquiasis además se ha relacionado con el desarrollo de colangiocarcinoma en vías biliares. Todos ellos son hallazgos relativamente poco frecuentes en laboratorios clínicos europeos, normalmente asociados a pacientes o viajeros provenientes de áreas endémicas¹³.

Diagnóstico convencional. Limitaciones

El examen microscópico de preparaciones en fresco obtenidas a partir de muestras fecales concentradas, sin modificar o teñidas con colorantes específicos, sigue siendo la técnica de referencia en muchos de los laboratorios clínicos de todo el mundo¹⁴. Debido a su bajo coste y mínimo equipamiento requerido, este método es particularmente adecuado para su uso en áreas endémicas con escasos recursos, donde la alta prevalencia parasitaria hace que la utilización de técnicas con mejores prestaciones diagnósticas no sea coste-efectiva. Sin embargo, la microscopía requiere personal técnico cualificado y tiempos elevados de procesamiento y análisis, presenta importantes

problemas de sensibilidad y especificidad diagnóstica y, en la mayoría de los casos, no permite la diferenciación morfológica de especies/genotipos. La microscopía de inmunofluorescencia solventa alguno de estos inconvenientes, pero es costosa y dependiente de la experiencia del observador¹⁵. En los últimos años se han desarrollado y comercializado un gran número de técnicas de diagnóstico rápidas basadas en inmunocromatografía y ELISA que proporcionan resultados en 10-240 min^{16,17}. Aunque prácticos y relativamente asequibles, estos métodos generan con frecuencia tasas elevadas de falsos resultados positivos y negativos^{18,19}, por lo que su uso está recomendado para el cribado de muestras, no para el diagnóstico definitivo.

Diagnóstico molecular

En países industrializados, en los que las tasas de infección por parásitos entéricos en la población autóctona son típicamente bajas o muy bajas², la sensibilidad de las técnicas de detección adquiere una relevancia crítica. Este hecho, unido a los elevados costes laborales, al incremento constante del volumen de muestras y peticiones diagnósticas, y la imperiosa necesidad de optimizar los flujos de trabajo de los laboratorios clínicos, hace necesario un cambio radical en la estrategia diagnóstica a adoptar^{20,21}. Esta situación explica por qué la microscopía convencional está siendo rápidamente reemplazada por técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como primera línea para el diagnóstico de patógenos entéricos en los laboratorios clínicos más modernos, principalmente en Europa y Estados Unidos^{17,21}. Esta tecnología, no solo mejora considerablemente el rendimiento diagnóstico de la microscopía^{22,23}, sino que además permite un elevado grado de automatización^{21,24}, posibilita la comparación directa de resultados interlaboratorios y facilita el proceso de acreditación de técnicas y procedimientos diagnósticos por agencias evaluadoras.

A pesar de su diversidad y sus particularidades epidemiológicas, muchos de los parásitos intestinales tienen como denominador común la excreción de alguna forma parasitaria (quistes/ooquistes, huevos, larvas, proglótides) junto con las heces del hospedador que parasitan. Debido a que las técnicas de diagnóstico molecular (PCR) son extremadamente sensibles a la calidad y cantidad de ADN, es esencial disponer de métodos eficaces que maximicen el proceso de rotura del material parasitario de partida, la extracción y purificación de ADN y la eliminación de sustancias inhibitorias de la reacción de amplificación²⁵.

Por otra parte, el rendimiento (sensibilidad, especificidad, cantidad de ADN amplificado, reproducibilidad, robustez) y utilidad práctica (diagnóstico clínico, cribado de muestras en estudios epidemiológicos, caracterización molecular de aislados) de cada protocolo de PCR va a depender en gran medida del formato utilizado, el gen y la región seleccionado que se debe amplificar, el diseño de los cebadores y la calidad de los reactivos (p. ej., polimerasa) utilizados²⁶. Actualmente existe una amplia variedad de PCR para la detección de protistas y helmintos entéricos, incluyendo PCR directas, anidadas, semianidadas, en tiempo real (qPCR, únicas o múltiples), asociada al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y basadas en mecanismos de amplificación isotérmica mediada por bucle (PCR-LAMP), entre otras (tablas 1 y 2). Las PCR anidadas y semianidadas ofrecen mejores rendimientos (en términos de sensibilidad y cantidad de ADN amplificado) que las PCR di-

Tabla 1

Principales técnicas y marcadores genéticos utilizados para la detección y caracterización molecular de los protistas parásitos entéricos más relevantes en salud humana

Filo/especie	Detección		Genotipado	
	Técnica	Marcador	Técnica	Marcador
Amoebozoa				
<i>Entamoeba histolytica</i>	LAMP, nPCR, qPCR, qPCRm	<i>ssu</i> rADN	PCR-RFLP, nPCR ^a	Quitinasa, TNC, SREHP, STR
Metamonada				
<i>Dientamoeba fragilis</i>	dPCR, nPCR, qPCR, qPCRm	<i>ssu</i> rADN	PCR-RFLP, nPCR ^a	Actina, EF-1 α , ITS, laminina A, <i>ssu</i> rADN
<i>Giardia duodenalis</i>	nPCR, qPCR, qPCRm	<i>ssu</i> rADN	PCR-RFLP, nPCR ^a	Actina, <i>bg</i> , EF-1 α , ferredoxina, <i>gdh</i> , <i>ssu</i> rADN, <i>tpi</i> , α -tubulina
Apicomplexa				
<i>Cryptosporidium</i> spp.	LAMP, nPCR, qPCR, qPCRm	<i>ssu</i> rADN	PCR-RFLP, nPCR ^a	<i>cowp</i> , <i>gp60</i> , <i>hsp70</i> , <i>ssu</i> rADN, STR, TRAP
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	dPCR, nPCR, qPCR, qPCRm	ITS, <i>ssu</i> rADN	nPCR ^a	<i>hsp70</i> , ITS, <i>ssu</i> rADN
<i>Cystoisospora belli</i>	nPCR, qPCR	ITS, <i>ssu</i> rADN	nPCR ^a	ITS, <i>ssu</i> rADN
<i>Sarcocystis</i> spp.	nPCR	ITS, <i>ssu</i> rADN	PCR-RFLP, nPCR ^a	ITS, <i>ssu</i> rADN
Ciliophora				
<i>Neobalantidium coli</i>	dPCR	ITS, <i>ssu</i> rADN	dPCR ^a	ITS, <i>ssu</i> rADN
Microsporidia				
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	nPCR, qPCR, qPCRm	ITS, <i>ssu</i> rADN	nPCR ^a	ITS, <i>ssu</i> rADN
<i>Enterocytozoon intestinalis</i>	nPCR, qPCR	ITS, <i>ssu</i> rADN	nPCR ^a	<i>ssu</i> rADN
Stramenopiles				
<i>Blastocystis</i> sp.	dPCR, qPCR, qPCRm	ITS, <i>ssu</i> rADN	dPCR ^a	ITS, <i>ssu</i> rADN

Tipos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): dPCR: PCR directa; nPCR: PCR anidada o semianidada; PCR-RFLP: PCR asociada al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; qPCR: PCR en tiempo real; qPCRm: PCR en tiempo real en formato múltiple.

Marcadores génicos: *bg*: beta giardina; *cowp*: proteína de la pared del oocisto; EF-1 α : factor de elongación 1 α ; *gdh*: glutamato deshidrogenasa; *gp60*: glucoproteína de 60 kDa; *hsp70*: proteína de choque térmico de 70 kDa; ITS: espaciador transcrito interno; LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle; SREHP: proteína de *Entamoeba histolytica* rica en serina; *ssu* rADN: ADN codificante del ARN de la subunidad ribosomal pequeña; STR: microsatélites; TNC: transcrito no codificante; *tpi*: triosa fosfato isomerasa; TRAP: proteína relacionada con la trombospodina adhesiva.

^aAsociado a la secuenciación de los productos de amplificación.

rectas, y se utilizan tanto para la detección como para el genotipado de patógenos protozoarios. Las qPCR, debido a su elevada sensibilidad, relativa sencillez de manejo y rapidez, están específicamente diseñadas para fines diagnósticos y se utilizan cada vez más en laboratorios clínicos (tablas 1 y 2), sobre todo en su formato múltiple (tabla 3). La elevada flexibilidad de este diseño permite el desarrollo de ensayos adaptados a la epidemiología de un área geográfica o un grupo de población concreto, así como su uso en el diagnóstico sintomático de patógenos causantes de diarrea, incluyendo agentes virales y bacterianos, de manera coste-efectiva^{27,28}. La PCR-RFLP es una técnica en desuso debido a la dificultad de interpretar con claridad los perfiles de bandas diagnósticas obtenidos tras la digestión de los amplicones generados, particularmente en el caso de infecciones mixtas. Finalmente, LAMP está inicialmente diseñada para emplearse como técnica de cribado en estudios epidemiológicos de campo en condiciones adversas y no suele ser una opción práctica en el laboratorio clínico.

Existe una gama creciente de protocolos de qPCR disponibles comercialmente para la detección de patógenos entéricos, con un claro interés en el desarrollo de ensayos para el diagnóstico simultáneo (sindrómico) de agentes causantes de enfermedad gastrointestinal de origen viral, bacteriano o parasitario^{17,24}. Aunque con cierto retraso comparativo, la misma tendencia empieza a observarse también en el caso de geohelminths (tabla 3). Algunos de estos métodos han recibido la aprobación de agencias de salud pública en varios países y

se están incorporando progresivamente en los algoritmos diagnósticos de muchos laboratorios clínicos, particularmente los que atienden a grandes poblaciones pediátricas, pacientes inmunocomprometidos o inmigrantes y viajeros procedentes de áreas endémicas²⁹.

La elección del marcador genético a amplificar es también un factor clave en el diseño de PCR y se debe tener en cuenta en función del uso al que se quiera destinar el ensayo. Así, el gen codificante del ARN de la subunidad ribosomal pequeña (*ssu* rADN), incluyendo regiones del espaciador transcrito interno (ITS), es el marcador de elección en las PCR para el diagnóstico de protistas y helmintos entéricos (tablas 1 y 2). Al ser *ssu* rADN (e ITS) un gen multicopia, existen multitud de dianas disponibles en la reacción inicial de amplificación, lo que aumenta considerablemente la sensibilidad del ensayo. Por el mismo motivo, ambos marcadores se usan frecuentemente en PCR de cribado en estudios epidemiológicos con gran número de muestras. El principal inconveniente de *ssu* rADN e ITS es que sus secuencias nucleotídicas están relativamente bien conservadas entre especies evolutivamente cercanas, por lo que pueden generar amplificaciones inespecíficas (falsos positivos). Este problema se puede detectar secuenciando el producto de amplificación obtenido y confirmando la especie de origen.

Para el genotipado de muestras ya identificadas como positivas al parásito de interés, el enfoque debe ser diferente, se necesitan marcadores moleculares que muestren una variabilidad en su secuencia nucleotídica lo suficientemente amplia como para permitir la dife-

Tabla 2

Principales técnicas y marcadores genéticos utilizados para la detección y caracterización molecular de los helmintos parásitos entéricos más relevantes en salud humana

Filo/especie	Detección		Genotipado	
	Técnica	Marcador	Técnica	Marcador
Cestodos				
<i>Diphyllobothrium</i> spp.	PCRm	Cox	dPCR	ssu rADN, ITS, cox, nad
<i>Taenia</i> spp.	PCR-RFLP, qPCRm, LAMP	ITS, HDP2, cox	dPCR ^a	cox
Nematodos				
<i>Ancylostoma</i> spp.	qPCR, qPCRm, nPCR	ITS	PCR-RFLP	ITS, cox, nad
<i>Anisakis</i> spp.	qPCR, qPCRm	ITS	PCR-RFLP	ITS, cox
<i>Ascaris lumbricoides</i>	qPCR, qPCRm	ITS	PCR-RFLP, nPCR ^a	ITS, mtDNA, cox, nad
<i>Necator americanus</i>	qPCR, qPCRm, dPCR	ITS	PCR-RFLP	ITS, cox, nad
<i>Strongyloides stercoralis</i>	qPCR, qPCRm	ssu rADN	dPCR ^a	cox, ssu rADN
<i>Trichinella spiralis</i>	PCRm	ITS, rADN	PCRm, PCR-RFLP	ITS, rADN
<i>Trichuris trichiura</i>	qPCR, qPCRm	ITS	PCR-RFLP, dPCR ^a , nPCR ^a	ITS, β -tubulina
Trematodos				
<i>Clonorchis sinensis</i>	qPCR, qPCRm	ITS	PCR-RFLP, dPCR ^a , nPCR ^a	β -tubulina, cox, EF-1 α , ITS, nad
<i>Fasciola</i> spp.	LAMP, dPCR, qPCRm	ITS, ssu rADN	PCR-RFLP, dPCR ^a , nPCR ^a	cox, ITS, nad, secuencias repetitivas de ADN
<i>Opisthorchis</i> spp.	LAMP, dPCR, nPCR, qPCR, qPCRm	ITS	dPCR ^a , nPCR ^a	cox, STR
<i>Paragonimus</i> spp.	LAMP, dPCR, nPCR, qPCR, qPCRm	ITS	dPCR ^a	cox, ITS

Tipos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): dPCR: PCR directa; nPCR: PCR anidada o semianidada; PCR-RFLP: PCR asociada al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; qPCR: PCR en tiempo real; qPCRm: PCR en tiempo real en formato múltiple.

Marcadores genéticos: cox: citocromo oxidasa; EF-1 α : factor de elongación 1 α ; ITS: espaciador transcrito interno; LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle; nad: NADH deshidrogenasa; ssu rADN: ADN codificante del ARN de la subunidad ribosomal pequeña; STR: microsatélites.

^aAsociado a la secuenciación de los productos de amplificación.

Tabla 3

Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real disponibles comercialmente para la detección simultánea de parásitos entéricos

Método	Compañía	Extracción automatizada de ADN incorporada	Parásitos detectados	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia seleccionada
Protistas						
AllPlex™	Seegene	Sí	Bl, Cc, Cr, Df, Eh, Gd	78-100	NE	80
BD MAX™	BD	Sí	Cr, Eh, Gd	95-100	99-100	81
FilmArray®	BioFire	Sí	Cc; Cr, Eh, Gd	100	89-100	82
xTAG	Luminex Corporation	Sí	Cr, Eh, Gd	95-100	89-100	83
EasyScreen™	Genetic Signatures	Opcional	Bl, Cr, Df, Ed, Eh, Gd	92-100	100	84
NanoCHIP®	Savyon Diagnostics	No	Bl, Cr, Df, Ed, Eh, Gd	98-100	95-100	83
Gastroenteritis	Diagenode	No	Cr, Eh, Gd	92-100	100	3
Ridagene	R-Biopharm	No	Cr, Eh, Gd	79-88	NE	80
FTD	Fast Track	No	Cr, Eh, Gd	53-100	NE	80
Helmintos						
AllPlex™	Seegene	Sí	An, As, En, Ev, Hy, Na, St, Ta, Tt	NE	NE	No publicado

An: *Ancylostoma* spp.; As: *Ascaris* spp.; Bl: *Blastocystis*; Cc: *Cyclospora cayetanensis*; Cr: *Cryptosporidium*; Df: *Dientamoeba fragilis*; Ed: *Entamoeba dispar*; Eh: *Entamoeba histolytica*; En: *Enterocytozoon* spp./*Encephalitozoon* spp.; Ev: *Enterobius vermicularis*; Gd: *Giardia duodenalis*; Hy: *Hymenolepis* spp.; Na: *Necator americanus*; St: *Strongyloides* spp.; Ta: *Taenia* spp.; Tt: *Trichiuris trichiura*; NE: no evaluado.

Tabla adaptada de referencia 17.

renciación entre distintos genotipos y subgenotipos. El principal inconveniente de este tipo de marcadores es que suelen ser genes de copia única, por lo que la sensibilidad de las PCR que los utilizan no es elevada. Esto explica que un porcentaje considerable de muestras positivas por *ssu*-PCR o ITS-PCR no se puedan amplificar en las PCR de genotipado correspondientes.

Infecciones por protistas

Existen más de 15 géneros de protistas capaces de infectar el tracto digestivo humano. Los patógenos de mayor relevancia en salud pública se distribuyen en seis filos incluyendo Amebozoa, Metamonada, Apicomplexa, Ciliophora, Microsporidia y Stramenopiles, todos ellos transmitidos principalmente por la ruta fecal-oral. Como se ha indicado anteriormente, la detección de este grupo de patógenos mediante PCR está casi exclusivamente limitada a los marcadores *ssu* rADN e ITS (tabla 1).

Entre los amebozoos, *E. histolytica* es la única especie que causa enfermedad en humanos. Estudios recientes han demostrado que solamente un número limitado de infecciones por *E. histolytica* progresa hasta causar síntomas clínicos, y existen diferencias moleculares en las cepas aisladas de individuos sintomáticos y asintomáticos. Estas diferencias se han estudiado en secuencias de los genes codificantes de las proteínas quitinasa y SREHP, en transcritos no codificantes y en microsatélites (tabla 1)³⁰. Dentro del filo Metamonada, *D. fragilis* es un protozoo de patogenidad incierta, cuya diversidad genética parece estar limitada a tan solo 2 genotipos (1 y 2) reconocidos del parásito. Estas variantes se han identificado usando marcadores bien conservados (*ssu* rADN, ITS) y genes constitutivos incluyendo actina y EF-1 α , entre otros (tabla 1)³¹. En cuanto a *G. duodenalis*, se han descrito 8 genotipos (A-H), de los cuales A y B son los que mayoritariamente causan giardiasis en humanos. La diferenciación de variantes inter e intragenotípicas se ha basado en el análisis de genes codificantes de proteínas enzimáticas (EF-1 α , ferredoxina, *gdh*, *tpi*), estructurales (actina, α -tubulina, *bg*), nucleosomales (histonas) o chaperoninas (*hsp60*), entre otras³².

Entre los apicomplejos, *Cryptosporidium* spp. es el género mejor estudiado molecularmente. De las 15 especies de *Cryptosporidium* capaces de infectar humanos, *C. hominis* y *C. parvum* son responsables del 90% de los casos reportados globalmente. La diversidad molecular intraespecie de *Cryptosporidium* se ha investigado a partir de varios marcadores (tabla 1), pero es sin duda la glucoproteína de 60 kDa (*gp60*) el que se utiliza más comúnmente debido a su alta variabilidad nucleotídica. Sobre la base de las secuencias de *gp60* se han identificado al menos 10 (Ia-Ik) familias subgenotípicas en *C. hominis* y 16 (IIa-IIp) en *C. parvum*³³. Aunque ampliamente utilizado, *gp60* presenta problemas de discriminación en algunas familias, como la Ib de *C. hominis*³⁴. La epidemiología molecular de otras especies pertenecientes al filo Apicomplexa, incluyendo *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli* y *Sarcocystis* spp., es mucho menos conocida y los pocos datos disponibles son los obtenidos a partir de marcadores relativamente conservados como *ssu* rADN e ITS (tabla 1). Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar y validar marcadores genotípicos para estos patógenos. Entre los candidatos evaluados se encuentran algunas regiones mitocondriales de *C. cayetanensis*³⁵, o los genes codificantes de las subunidades de la enzima citocromo oxidasa y de la ARN polimerasa de *Sarcocystis* spp.³⁶.

Neobalantidium coli es el único protozoo ciliado que infecta humanos, entre otros animales homeotermos³⁷. Debido a que su principal reservorio son los suinos, la balantidiosis se considera una enfermedad ocupacional que afecta principalmente a personas en estrecho contacto con estos animales o sus excrementos. A nivel molecular *N. coli* es una especie genéticamente muy conservada, al menos en los marcadores *ssu* rADN e ITS. Los estudios orientados a la identificación de posibles genotipos o subgenotipos del parásito son muy limitados³⁸.

E. bienewsi es el microsporidio que con mayor frecuencia produce microsporidiosis, afecta principalmente a individuos inmunodeprimidos, pero también a inmunocompetentes. Actualmente, la identificación y caracterización de *E. bienewsi* está basada en la amplificación y secuenciación de la región ITS, a partir de la cual se han podido identificar más de 250 genotipos, con una amplia diversidad genética entre ellos³⁹. Estos genotipos se han dividido en 9 grupos, y los grupos 1 y 2 contienen los genotipos infectivos para el hombre y/o con potencial zoonótico⁴⁰.

Blastocystis sp. se considera el protista más frecuente en heces humanas. Aunque su patogenidad es cuestionada por algunos autores, hay estudios que relacionan este protista con diversos trastornos intestinales (incluyendo síndrome de colon irritable) y urticaria. *Blastocystis* sp. posee una gran diversidad genética que ha permitido la identificación de al menos 17 subtipos, de los cuales ST1-9 y ST12 se han descrito en humanos⁴¹. Al igual que en el caso de *E. bienewsi*, el método más extendido para detectar y genotipar (incluso a nivel de alelo) las variantes genéticas de *Blastocystis* es el análisis de secuencias ITS⁴².

Infecciones por geohelmintos

Existen más de 340 especies de helmintos asociadas a humanos, la mayoría son zoonosis poco frecuentes, destacan *A. lumbricoides*, *A. duodenale*, *N. americanus* y *S. stercoralis* (clase Chromadorea) y *T. trichiura* (clase Enoplea) como principales especies causantes de las geohelmintiasis en el ser humano⁴³. El mecanismo de transmisión es a través de la ingesta de huevos infectantes o por penetración a través de la piel de larvas infectivas. Existen diferentes métodos de diagnóstico basado en PCR, y destacan la qPCR dirigida a la amplificación de ADN ribosomal, la secuencias ITS y el ADN mitocondrial de estos parásitos (tabla 2). A lo largo de los últimos años ha cobrado gran importancia la técnica qPCR en formato múltiple utilizando sondas de hidrólisis (TaqMan)⁴⁴.

Ascaris lumbricoides es el geohelminto más prevalente y se ubica en el intestino delgado de su hospedador. Se dispone de numerosas técnicas moleculares para la detección de este parásito, la mayoría dirigidas a la amplificación de la región ITS en formato múltiple utilizando sondas TaqMan^{44,45}, o combinadas con la plataforma Luminex⁴⁶. Se han realizado estudios de genotipado de ITS y genes mitocondriales para estudiar la epidemiología de *Ascaris* spp. y evaluar su posible potencial zoonótico. Estos estudios han revelado que existen haplotipos comunes para *A. suum* y *A. lumbricoides* que generan numerosos híbridos, por lo que algunos autores proponen agrupar a las 2 especies en una única⁴⁷.

Trichuris trichiura es la principal especie causante de trichuriasis en el ser humano y generalmente se localiza en el ciego. Los protocolos de detección molecular son escasos debido a la dificultad de extracción del ADN parasitario por la robustez de los huevos⁴⁸. Destacan 2 qPCR dirigidas a la amplificación de un fragmento del gen ITS, una en formato simple⁴⁹ y otra múltiple, en las que además se incluye la detección de otros geohelmintos⁴⁴. Gracias a la secuenciación de un fragmento del gen ITS se ha podido describir que el ser humano se puede infectar por la especie *Trichuris suis*, específica del ganado porcino⁵⁰. Morfológicamente esta especie es indistinguible de *T. trichiura*, pero se han llevado a cabo análisis de los genes *ssu* rADN e ITS que muestran que son especies genéticamente diferentes, aunque estrechamente relacionadas^{51,52}.

Ancylostoma duodenale y *N. americanus* son los principales parásitos causantes de la uncinariasis. Se caracterizan por la anemia grave que producen en el hospedador, y llegan a ingerir grandes cantidades de sangre de este⁵³. Los huevos producidos por ambos parásitos son muy lábiles e indistinguibles por microscopía, por lo que la aplicación de técnicas moleculares está muy extendida, siendo el principal marcador el ITS tanto en formato simple^{49,54} como en formato múltiple^{44,55,56}. La diversidad genética de las especies de uncinarias se ha

estudiado principalmente mediante la secuenciación de los marcadores ITS y *cox* (tabla 2), que proporciona puntos determinantes a la hora de abordar las estrategias de control, así como la resistencia a fármacos y el desarrollo de posibles vacunas⁵⁷.

Strongyloides stercoralis y *S. fuelleborni* son las 2 únicas especies descritas que causan la estrongiloidiasis humana. Este parásito, a diferencia del resto de los geohelminths, tiene la peculiaridad de que puede producir ciclos de autoinfección, lo que favorece la persistencia de la enfermedad durante décadas. Además, principalmente en individuos inmunodeprimidos, puede desarrollarse el síndrome de hiperinfección e infección diseminada⁵⁸. La dificultad del diagnóstico parasitológico ha llevado a un importante desarrollo de los protocolos moleculares, y la diana más frecuente es el *ssu rADN* amplificada mediante qPCR en formatos simple⁵⁹⁻⁶¹ y múltiple^{44,45}. Los estudios de genotipado son escasos y los que mayor información proporcionan son los realizados a partir de larvas del nematodo⁶².

Infecciones por nematodos transmitidos por alimentos

Entre las infecciones por nematodos transmitidas por alimentos destaca la anisakidosis causada por los géneros *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Hysterothylacium* spp. y *Contracaecum* spp. Dentro del género *Anisakis* spp. Se han reportado 3 especies como causa de la anisakiasis en humanos: *Anisakis simplex* sensu stricto, *A. pegreffii* y *A. physeteris*⁶³, las dos primeras especies son las de mayor importancia zoonótica⁶⁴. A pesar del extenso uso del diagnóstico serológico, en los últimos años se han desarrollado ensayos moleculares de detección múltiple que permiten identificar además los otros géneros de anisákidos⁶⁵. Los estudios de secuenciación del gen *cox* han mostrado que es altamente polimórfico en *Anisakis* spp. y, por lo tanto, es particularmente útil para identificar las especies involucradas en la producción de híbridos (tabla 2)¹⁰.

La triquinosis es una zoonosis de distribución cosmopolita causada por nematodos del género *Trichinella*. Actualmente se han descrito 9 especies y 3 genotipos, en el ser humano la especie más frecuente es *T. spiralis*. A nivel diagnóstico, las técnicas serológicas son las más empleadas, pero la identificación de especie, imprescindible en la investigación y gestión de brotes, únicamente puede realizarse con la utilización de técnicas moleculares. En este sentido destaca el desarrollo de una PCR multiplex basada en la amplificación de un fragmento del gen ITS y de una región del segmento V del rADN, que permite la detección y discriminación de 7 especies (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni* y *T. papua*) y 2 genotipos (T6 y T11) (tabla 2)¹¹.

Infecciones por cestodos transmitidos por alimentos

Las principales especies de cestodos que afectan al ser humano son *Taenia solium*, *T. saginata* y *Diphyllobothrium latum*. Las infecciones por estos patógenos se adquieren por el consumo de carne o pescado crudo o poco cocinado que contiene los estadios larvarios (p. ej., cisticercos) de estos parásitos. El riesgo de desarrollar cisticercosis que conlleva la infección por *T. solium* en el hombre hace imprescindible disponer de herramientas diagnósticas que permitan la diferenciación entre especies, ya que morfológicamente los huevos de ténidos son indistinguibles mediante microscopía. Existe una tercera especie (*T. asiatica*) que también causa teniasis en el ser humano pero, a diferencia de las anteriores, está geográficamente restringida a países del sudeste asiático. Para la detección de las diferentes especies de ténidos se dispone de numerosas técnicas moleculares, entre las que se encuentran la PCR convencional, la PCR-RFLP, la qPCR y la LAMP, y las más desarrolladas son las de formato múltiple, que permiten diferenciar entre las diferentes especies (tabla 2).

Existen protocolos de PCR para el diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata* basados en la amplificación del fragmento HDP2 a partir de ADN procedente tanto de proglótides como de huevos en

muestras de heces²⁴. Además, se ha desarrollado, a partir del ADN obtenido de muestras de heces, un ensayo qPCR que amplifica un fragmento del marcador ITS y gracias a la utilización de sondas de hidrólisis TaqMan permite identificar las diferentes especies reportando altos valores de sensibilidad y especificidad⁶⁶. Sin embargo, actualmente es más frecuente la aplicación de los protocolos de PCR múltiple destinados a la detección de las 3 especies (*T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*) con la amplificación de un fragmento del gen *cox* (tabla 2)⁶⁷⁻⁶⁹. También hay protocolos de PCR-RFLP que amplifican genes de proteínas mitocondriales a partir únicamente de proglótides, por lo que su uso está limitado para las muestras de heces^{70,71}. Por último, se han propuesto protocolos basados en LAMP para la detección simultánea de las 3 especies, que se basan en la amplificación del gen *cox*⁷².

Dentro del género *Diphyllobothrium* existen 14 especies que son capaces de causar difilobotriosis en humanos. La especie más común es *D. latum*, aunque cada vez es más frecuente la descripción de casos por las especies *D. pacificum*, *D. dendriticum* y *D. nihonkaiense*⁷³. A pesar de que la clínica y el tratamiento son similares, es importante conocer la especie para tener una mayor información epidemiológica. Por este motivo, para su detección molecular se ha desarrollado una PCR multiplex capaz de diferenciar estas especies mediante la amplificación de un fragmento del gen *cox* (tabla 2)⁷³. No obstante, también existen protocolos que permiten la identificación de otras especies diferentes mediante la amplificación y secuenciación de regiones de los genes *ssu rADN*, ITS, *cox* y *nad* (tabla 2)^{74,75}.

Infecciones por trematodos transmitidos por alimentos

Al menos 80 especies de trematodos, muchas de ellas zoonóticas, se pueden transmitir por alimentos crudos o poco cocinados que contienen las formas infectivas (metacercarias) de estos patógenos²⁴. Su epidemiología y diversidad molecular son poco conocidas, por lo que no existen protocolos estandarizados para el genotipado de estos parásitos. Las infecciones por *Opisthorchis* spp. (principalmente *O. viverrini* y *O. felinus*) son relativamente comunes en áreas endémicas del sudeste asiático. Estudios recientes mediante electroforesis de enzimas multilocus y análisis de microsatélites, han demostrado que *O. viverrini* es en realidad una especie críptica constituida por 2 especies morfológicamente muy similares pero molecularmente diferentes que presentan variaciones genéticas entre diferentes poblaciones⁷⁶. Los estudios de secuenciación multilocus llevados a cabo con *C. sinensis*, una especie emparentada evolutivamente con el género *Opisthorchis*, también indican un elevado grado de diversidad en las secuencias analizadas que probablemente reflejan los patrones de distribución geográfica del parásito⁷⁷. Estos estudios coinciden en indicar que ITS es el marcador más fiable para el estudio de la epidemiología molecular de *C. sinensis* (tabla 2).

Se dispone de algo más de información en el caso de las infecciones causadas por *Fasciola* spp., donde la detección, diferenciación (*F. hepatica* frente a *F. gigantica*) y genotipado de aislados del parásito se han investigado en un número significativo de marcadores moleculares, entre los que destacan ITS y diversos genes mitocondriales (tabla 2). Los estudios que se han realizado hasta la fecha parecen indicar que *Fasciola* es un género relativamente bien conservado evolutivamente, con una limitada diversidad genética, al menos en los marcadores analizados⁷⁸. Finalmente, la detección de infecciones por especies del género *Paragonimus* está restringida al uso del marcador ITS, y apenas hay estudios sobre la variabilidad molecular de este trematodo. Uno de los pocos que hay, basado en el análisis de secuencias de ITS y varios genes mitocondriales, apunta a la existencia de 3 genotipos diferentes dentro de *P. westermani*⁷⁹.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Kotloff KL. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64:799-814.
- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25:420-49.
- Laude A, Valot S, Desoubreux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, et al. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:190.e1-8.
- Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks—An update 2011–2016. *Water Res*. 2017;114:14-22.
- Stark D, Barratt JL, Van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:634-50.
- Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the neglected trichomonad of the human bowel. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29:553-80.
- Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014;6:17.
- Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*. 2009;373:1570-5.
- Oliveira D, Ferreira FS, Atouguia J, Fortes F, Guerra A, Centeno-Lima S. Infection by intestinal parasites, stunting and anemia in school-aged children from southern Angola. *PLoS One*. 2015;10:e0137327.
- Aibinu IE, Smooker PM, Lopata AL. *Anisakis* nematodes in fish and shellfish— from infection to allergies. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2019;9:384-93.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:127-45.
- Debacq G, Moyano LM, Garcia HH, Boumediene F, Marin B, Ngoungou EB, et al. Systematic review and meta-analysis estimating association of cysticercosis and neurocysticercosis with epilepsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005153.
- Robertson LJ. Parasites in food: From a neglected position to an emerging issue. *Adv Food Nutr Res*. 2018;86:71-113.
- McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014;52:712-20.
- Roellig DM, Yoder JS, Madison-Antenucci S, Robinson TJ, Van TT, Collier SA, et al. Community laboratory testing for *Cryptosporidium*: Multicenter study retesting public health surveillance stool samples positive for *Cryptosporidium* by rapid cartridge assay with direct fluorescent antibody testing. *PLoS One*. 2017;12:e0169915.
- Ricciardi A, Ndao M. Diagnosis of parasitic infections: what's going on? *J Biomol Screen*. 2015;20:6-21.
- Ryan U, Papparini A, Oskam C. New technologies for detection of enteric parasites. *Trends Parasitol*. 2017;33:532-46.
- de Lucio A, Martínez-Ruiz R, Merino FJ, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I, et al. Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PLoS One*. 2015;10:e0143981.
- de Lucio A, Merino FJ, Martínez-Ruiz R, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I, et al. Molecular genotyping and sub-genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *Infect Genet Evol*. 2016;37:49-56.
- Verweij JJ. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology*. 2014;141:1863-72.
- Van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect*. 2015;1:520-8.
- Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, Van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1001-7.
- Verweij JJ, Van Lieshout L. Intestinal parasitic infections in an industrialized country; a new focus on children with better DNA-based diagnostics. *Parasitology*. 2011;138:1492-8.
- Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:371-418.
- Paulos S, Mateo M, de Lucio A, Hernández-de Mingo M, Bailo B, Saugar JM, et al. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J Microbiol Methods*. 2016;127:68-73.
- Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:Unit 10.20.
- Goldenberg SD, Bacelar M, Brazier P, Bisnauthsing K, Edgeworth JD. A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalised patients. *J Infect*. 2015;70:504-11.
- Freeman K, Mistry H, Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N, Taylor-Phillips S, et al. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*. 2017;21:1-188.
- Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3723-8.
- Ali IK, Clark CG, Petri WA. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol*. 2008;8:698-707.
- Cacciò SM. Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Trop*. 2018;184:73-7.
- Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol*. 2013;43:943-56.
- Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 2014;141:1667-85.
- Chalmers RM, Pérez-Cordón G, Cacciò SM, Klotz C, Robertson LJ. *Cryptosporidium* genotyping in Europe: The current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Exp Parasitol*. 2018;191:25-30.
- Nascimento FS, Barta JR, Whale J, Hofstetter JN, Casillas S, Barratt J, et al. Mitochondrial junction region as genotyping marker for *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:1314-9.
- Kirilova V, Prakas P, Calero-Bernal R, Gavarne I, Fernández-García JL, Martínez-González M, et al. Identification and genetic characterization of *Sarcocystis arctica* and *Sarcocystis lutrae* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Baltic States and Spain. *Parasit Vectors*. 2018;11:173.
- Pomajbíková K, Oborník M, Horák A, Petrželková KJ, Grim JN, Levecke B, et al. Novel insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst-forming ciliates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2140.
- Ponce-Gordo F, Fonseca-Salamanca F, Martínez-Díaz RA. Genetic heterogeneity in internal transcribed spacer genes of *Balantidium coli* (Litostomatea, Ciliophora). *Protist*. 2011;162:774-94.
- Santín M. *Enterocytozoon bienersi*. En: Xiao L, Ryan U, Feng Y, editors. *Biology of Foodborne Parasites*. Boca Raton: CRC Press; 2015. p. 149-74.
- Li W, Feng Y, Santín M. Host specificity of *Enterocytozoon bienersi* and public health implications. *Trends Parasitol*. 2019;35:436-51.
- Clark CG, Van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol*. 2013;82:1-32.
- Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006;157:77-85.
- Coombs I, Crompton DWT. A guide to human helminths. London: Taylor and Francis; 1991.
- Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, et al. Application of a multiplex quantitative PCR to assess prevalence and intensity of intestinal parasite infections in a controlled clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004380.
- Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:338-43.
- Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout L, Petri WA, et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:332-7.
- Leles D, Araujo A, Vicente AC, Iniguez AM. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;163:167-70.
- Kaisar MMM, Brien EA, Djuardi Y, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Verweij JJ, et al. Improved diagnosis of *Trichuris trichiura* by using a bead-beating procedure on ethanol preserved stool samples prior to DNA isolation and the performance of multiplex real-time PCR for intestinal parasites. *Parasitology*. 2017;144:965-74.
- Mejia R, Vicuna Y, Broncano N, Sandoval C, Vacca M, Chico M, et al. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:1041-7.
- Nissen S, Al-Jubury A, Hansen TV, Olsen A, Christensen H, Thamsborg SM, et al. Genetic analysis of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* recovered from humans and pigs in a sympatric setting in Uganda. *Vet Parasitol*. 2012;188:68-77.
- Cutillas C, Callejo R, De Rojas M, Tewes B, Ubieda JM, Ariza C, et al. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Trop*. 2009;111:299-307.
- Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol*. 2013;51:472-80.
- Muller R. Worms and human disease. 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing; 2002.
- Sharifdini M, Ghanbarzadeh L, Kouhestani-Maklavani N, Mirjalali H, Saraei M. Prevalence and molecular aspects of human hookworms in Guilan Province, Northern Iran. *Iran J Parasitol*. 2017;12:374-81.
- Verweij JJ, Brien EA, Ziem J, Yelifari L, Polderman AM, Van Lieshout L. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:685-90.
- Gordon CA, McManus DP, Acosta LP, Olveda RM, Williams GM, Ross AG, et al. Multiplex real-time PCR monitoring of intestinal helminths in humans reveals widespread polyparasitism in Northern Samar, the Philippines. *Int J Parasitol*. 2015;45:47-83.
- Gasser RB, Cantacessi C, Loukas A. DNA technological progress toward advanced diagnostic tools to support human hookworm control. *Biotechnol Adv*. 2008;26:35-45.
- Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli AF, Levecke B, Socias E, et al. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2165.
- Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brien EA, Polderman AM, et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:342-6.
- Saugar JM, Merino FJ, Martín-Rabadán P, Fernández-Soto P, Ortega S, Garate T, et al. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Trop*. 2015;142:20-5.

61. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:306-11.
62. Jaleta TG, Zhou S, Bemm FM, Schar F, Khieu V, Muth S, et al. Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans-Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005752.
63. Mattiucci S, Nascetti G. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasitol.* 2008;66:47-148.
64. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. *Anisakis*--a food-borne parasite that triggers allergic host defences. *Int J Parasitol.* 2013;43:1047-57.
65. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol Int.* 2008;57:49-53.
66. Praet N, Verweij JJ, Mwape KE, Phiri IK, Muma JB, Zulu G, et al. Bayesian modelling to estimate the test characteristics of coprology, coproantigen ELISA and a novel real-time PCR for the diagnosis of taeniasis. *Trop Med Int Health.* 2013;18:608-14.
67. Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, et al. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:548-53.
68. Anantaphruti MT, Yamasaki H, Nakao M, Waikagul J, Watthanakulpanich D, Nuanthanong S, et al. Sympatric occurrence of *Taenia solium*, *T. saginata*, and *T. asiatica*, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1413-6.
69. Jeon HK, Chai JY, Kong Y, Waikagul J, Insisiengmay B, Rim HJ, et al. Differential diagnosis of *Taenia asiatica* using multiplex PCR. *Exp Parasitol.* 2009;121:151-6.
70. Mwape KE, Phiri IK, Praet N, Muma JB, Zulu G, Van den Bossche P, et al. *Taenia solium* infections in a rural area of Eastern Zambia-a community based study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1594.
71. Devleeschauwer B, Aryal A, Joshi DD, Rijal S, Sherchand JB, Praet N, et al. Epidemiology of *Taenia solium* in Nepal: is it influenced by the social characteristics of the population and the presence of *Taenia asiatica*? *Trop Med Int Health.* 2012;17:1019-22.
72. Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol.* 2009;47:168-74.
73. Wicht B, Yanagida T, Scholz T, Ito A, Jimenez JA, Brabec J. Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: *Diphyllobothrium*) infecting humans. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3111-6.
74. Guo AJ, Liu K, Gong W, Luo XN, Yan HB, Zhao SB, et al. Molecular identification of *Diphyllobothrium latum* and a brief review of diphyllobothriosis in China. *Acta Parasitol.* 2012;57:293-6.
75. De Marval F, Gottstein B, Weber M, Wicht B. Imported diphyllobothriosis in Switzerland: molecular methods to define a clinical case of *Diphyllobothrium* infection as *Diphyllobothrium dendriticum*, August 2010. *Euro Surveill.* 2013;18:20355.
76. Laoprom N, Sithithaworn P, Andrews RH, Ando K, Laha T, Klinbunga S, et al. Population genetic structuring in *Opisthorchis viverrini* over various spatial scales in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1906.
77. Sun J, Huang Y, Huang H, Liang P, Wang X, Mao Q, et al. Low divergence of *Clonorchis sinensis* in China based on multilocus analysis. *PLoS One.* 2013;8:e67006.
78. Ai L, Chen MX, Alasaad S, Elsheikha HM, Li J, Li HL, et al. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches. *Parasit Vectors.* 2011;4:101.
79. Rekha Devi K, Narain K, Mahanta J, Nirmolia T, Blair D, Saikia SP, et al. Presence of three distinct genotypes within the *Paragonimus westermani* complex in northeastern India. *Parasitology.* 2013;140:76-86.
80. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. *PLoS One.* 2019;14:e0215068.
81. Batra R, Judd E, Eling J, Newsholme W, Goldenberg SD. Molecular detection of common intestinal parasites: a performance evaluation of the BD Max™ Enteric Parasite Panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:1753-7.
82. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2015;53:915-25.
83. Perry MD, Corden SA, Howe RA. Evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel and the Savyon Diagnostics Gastrointestinal Infection Panel for the detection of enteric pathogens in clinical samples. *J Med Microbiol.* 2014;63:1419-26.
84. Stark D, Roberts T, Ellis JT, Marriott D, Harkness J. Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78:149-52.