



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
UNIDAD DE POSGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GIARDIASIS EN NIÑOS DE EDAD
ESCOLAR EN ECUADOR”

AUTOR:

Blgo. FABIÁN ORLANDO
AGUILAR MORA

TUTORA:

Ph.D. ANA LUCÍA RUANO NIETO

GUAYAQUIL – ECUADOR

AGOSTO 2017



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS

TÍTULO Y SUBTÍTULO:

“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GIARDIASIS EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR EN ECUADOR”

AUTOR:

Blgo. Fabián Orlando Aguilar Mora

TUTORA:

Ph.D. Ana Lucía Ruano Nieto

REVISORES:

(Ing. Sisiana Chávez Chica, Mg.)
Dra. Greta Franco

INSTITUCIÓN:**FACULTAD:**

Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo

CARRERA:

Maestría en Biotecnología molecular

FECHA DE PUBLICACIÓN:**No. DE PÁGS:****TÍTULO OBTENIDO:**

Maestría en Biotecnología Molecular

ÁREAS TEMÁTICAS:

Ciencias de la Vida

PALABRAS CLAVE: Diagnóstico Molecular, giardiasis, *Giardia lamblia*, PCR

RESUMEN: El protozoario *Giardia lamblia* es causante de infecciones gastrointestinales y enfermedades diarreicas en humanos provocando elevada morbilidad en nuestro medio, en el presente estudio se estableció su prevalencia a través del análisis óptico y molecular de muestras de heces en escolares del territorio nacional, se determinó el método diagnóstico más adecuado para el país y se analizaron factores de riesgo asociados a la infección del parásito. Los resultados obtenidos permiten tener un mejor conocimiento del estado actual de la giardiasis en Ecuador, abriendo nuevas opciones para un diagnóstico temprano y control de esta parasitosis.

No. DE REGISTRO (en base de datos):

x

No. DE CLASIFICACIÓN:**DIRECCIÓN URL** (tesis en la web):**ADJUNTO PDF:**

SI

NO

CONTACTO CON AUTOR/ES

Teléfono: 0984103688

E-mail:

CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:

Nombre: Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo

Teléfono: 2325530-38 Ext. 114

E-mail: upid@ug.edu.ec

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutora del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, **CERTIFICO:** que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular titulada: **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GIARDIASIS EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR EN ECUADOR**, la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Firma

Quito, Agosto de 2017

Ph.D. Ana Lucía Ruano Nieto

N° de cédula: 1710090604

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

Yo, Lenin Javier Ramirez Cando, con registro del SENESCYT 7470 R-15-26820, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR:** Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborada por el Blgo. Fabián Orlando Aguilar Mora, con C.I. 1717348088, previo a la obtención del título de MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

Tema de tesis: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE GIARDIASIS EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR EN ECUADOR

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

Ing. M.Sc. Lenin Ramirez Cando PHD(c)

N° Cédula: 1104250426

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, Fabián Orlando Aguilar Mora, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentadas es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Firma. -----

Cédula: 1717348088

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron a cumplir esta meta, especialmente a mi padre que siempre será una luz en mi camino y a mi madre que siempre ha sabido brindarme su amor.

A mi amor Jennifer que a pesar de todas las dificultades siempre me ha apoyado y me ha ayudado a salir adelante.

A mi directora Ph.D. Ana Lucía Ruano por toda su ayuda y predisposición al compartir su sabiduría.

Al programa PROPAD por su inigualable apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos y compañeros por brindarme siempre su apoyo.

DEDICATORIA

A todos los niños que colaboraron donando sus muestras para el proyecto PROPAD, sin sus lágrimas y el sacrificio de sus padres no se hubieran logrado los objetivos propuestos.

«La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible».

Carl Sagan (1934 – 1996)

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICADO DEL TUTOR.....	I
CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO.....	II
DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR.....	III
AGRADECIMIENTO	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO I	7
1. PROBLEMÁTICA.....	8
1.1. Planteamiento del problema.....	8
CAPÍTULO II.....	10
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1. Enfermedades infecciosas	11
2.2. Enfermedades parasitarias.....	12
2.3. Epidemiología de las infecciones por el parásito <i>G. lamblia</i> ...12	
2.4. Características de la infección por el parásito <i>G. lamblia</i>	15
2.4.1. Clasificación taxonómica.....	15
2.4.2. Descubrimiento del parásito <i>Giardia lamblia</i>	16
2.4.3. Ciclo de vida	17
2.4.4. Morfología.....	18
2.4.5. Patología.....	19
2.4.6. Epidemiología.....	21
2.4.7. Genotipaje de <i>Giardia lamblia</i>	21

2.5. Pruebas diagnósticas	23
2.5.1. Coproparasitario simple.....	23
2.5.2. Técnicas de flotación y sedimentación.....	23
2.5.2.1. Las técnicas de sedimentación.....	24
2.5.2.2. Las técnicas de flotación.....	24
2.5.3. PCR en tiempo real.....	25
2.5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR punto final).....	26
2.6. Tratamiento	26
CAPÍTULO III.....	28
3. METODOLOGÍA	29
3.1. Aspecto ético legal	29
3.2. Consentimiento informado y encuesta.....	29
3.3. Instituciones	30
3.4. Zona de estudio y número de muestras analizadas	30
3.5. Período de investigación	30
3.6. Metodología para la recolección de muestras biológicas.....	30
3.6.1. Acercamiento previo a las escuelas.....	31
3.6.2. Talleres informativos sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de parasitosis.....	31
3.6.3. Toma de muestras biológicas.....	31
3.6.3.1. Obtención y manejo de muestras biológicas de heces.....	32
3.6.3.1.1. Factores condicionales de la muestra.....	32
3.6.3.1.2. Preparación del paciente.....	32
3.6.3.1.3. Consideraciones especiales previas a la toma de muestra.....	33
3.6.3.1.4. Área de colecta y procesamiento de muestras....	33
3.6.3.1.5. Colecta de muestra.....	33
3.6.3.1.6. Horario de colecta.....	34
3.6.3.1.7. Alícuotas y conservación de muestras biológicas (heces).....	34
3.6.3.1.8. Transporte de muestras refrigeradas.....	35

3.7. Procesamiento de muestras biológicas.....	36
3.7.1. Examen microscópico de preparaciones húmedas	36
3.8. Población.....	37
3.9. Tipos de estudio criterios de inclusión / exclusión	37
3.10. Controles positivos.....	38
3.10.1. Protocolo de flotación de quistes de <i>Giardia lamblia</i> con sulfato de zinc a partir de muestras biológicas - heces fecales.....	38
3.10.1.1. Fundamento.....	38
3.10.1.2. Procedimiento.....	38
3.11. Extracción de ADN de parásito puro.....	39
3.12. Extracción de ADN de muestras biológicas.....	40
3.13. Cuantificación de ADN.....	41
3.14. Normalización de ADN.....	42
3.15. Estandarización del diagnóstico de <i>Giardia lamblia</i> por técnicas moleculares en muestras biológicas.....	42
3.16. Reacción en cadena de la polimerasa punto final para el gen 18S de <i>Giardia lamblia</i>	43
3.16.1. Optimización de la PCR y diagnóstico de <i>G. lamblia</i> en muestras biológicas.....	43
3.16.2. Especificidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.....	44
3.17. Electroforesis en gel de agarosa.....	45
3.18. Análisis de datos.....	45
3.19. Análisis estadístico.....	45
3.20. Análisis de factores de riesgo.....	46
CÁPITULO IV	48
4. RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS	49
4.1. Diagnóstico por microscopía óptica.....	49
4.2. Extracción de ADN parasitario para control positivo.....	50
4.3. Optimización del método de extracción de ADN de <i>Giardia lamblia</i> en muestras biológicas.....	51
4.4. Normalización de ADN total en muestras biológicas.....	52
4.5. Extracción de ADN total en muestras biológicas.....	54

4.6. Determinación del diagnóstico de <i>Giardia lamblia</i> por técnicas moleculares en muestras biológicas.....	54
4.6.1. Optimización de la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S rRNA de <i>Giardia lamblia</i>	55
4.6.2. Gradiente de temperatura de la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S rRNA de <i>Giardia lamblia</i>	55
4.6.3. Diferente concentración de cebadores para la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S de <i>G. lamblia</i>	56
4.7. Especificidad de las pruebas moleculares.....	58
4.8. Límite de detección de pruebas moleculares.....	58
4.9. Análisis de datos.....	60
4.10. Prevalencia de <i>Giardia lamblia</i>	61
4.11. Análisis estadístico.....	63
4.11.1. Coeficiente Kappa de Cohen.....	63
4.11.2. Valoración de la fuerza de concordancia.....	64
4.11.3. Validez de la prueba: sensibilidad y especificidad.....	65
4.11.3.1. Diagnóstico molecular (Dicromato de potasio)....	65
4.11.3.2. Diagnóstico molecular (Etanol).....	65
4.11.4. Correlación con variables socioeconómicas.....	66
4.11.4.1. Procedencia del agua.....	66
4.11.4.2. Presencia de animales en el hogar.....	66
4.11.4.3. Lavado de manos.....	66
4.11.4.4. Tipo de vivienda.....	67
4.10.4.5. Nivel de instrucción del jefe del hogar.....	67
4.11.5. Correlación con variables antropométricas - IMC.....	67
CÁPITULO V	69
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1. Conclusiones.....	70
5.2. Recomendaciones.....	77
6. BIBLIOGRAFÍA	79
8. ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trofozoito de <i>Giardia lamblia</i>	18
Figura 2. Quiste de <i>Giardia lamblia</i> de muestra biológica.....	19
Figura 3. Conservación de muestras con gel refrigerante.....	36
Figura 4. Sedimentación de perlas magnéticas con protocolo MagaZorb®.....	40
Figura 5. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de <i>G. lamblia</i> por microscopia óptica.	49
Figura 6. Prevalencia total de parasitosis analizadas por microscopía.....	50
Figura 7. Resultado de curva de absorbancia de ADN de control positivo de <i>G. lamblia</i>	51
Figura 8. Foto de gel de agarosa al 1.8% de ADN de parásito extraído.....	52
Figura 9. Convergencia de las concentraciones de ADN en las muestras conservadas en etanol 70%.	53
Figura 10. Convergencia de las concentraciones de ADN en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.	53
Figura 11. Gel electroforesis 4X con gradiente de temperatura	55
Figura 12. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR con diferente concentración de cebadores.....	56
Figura 13. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de <i>G. lamblia</i> por PCR punto final en muestras conservadas de etanol 70%.	57
Figura 14. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de <i>G. lamblia</i> por PCR punto final en muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.	57
Figura 15. Ensayo de especificidad de cebadores para PCR.....	58
Figura 16. Límite de detección mediante diluciones seriadas.	59
Figura 17. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR de diagnóstico molecular de <i>Giardia lamblia</i>	60
Figura 18. Gráfico de resultados (%) en relación a los distintos tipos de diagnóstico.....	61
Figura 19. Gráfico de prevalencia total comparando los métodos de diagnóstico utilizados.	62
Figura 20. Gráfico de prevalencia de giardiasis por provincias mediante diagnóstico molecular.....	62
Figura 21. Condición nutricional de los individuos en la muestra...72	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Términos de inclusión y exclusión para los participantes.	37
Tabla 2. Fórmula para el cálculo de normalización	42
Tabla 3. Especificaciones de los cebadores para el gen 18S de <i>Giardia lamblia</i>	43
Tabla 4. Parámetros para resultados de PCR y microscopía.....	45
Tabla 5. Factores analizados en el estudio	46
Tabla 6. Tabla de contingencia microscopía*dicromato	63
Tabla 7. Coeficiente Kappa para la tabla microscopía*dicromato de potasio.....	63
Tabla 8. Tabla de contingencia microscopía*etanol.....	63
Tabla 9. Coeficiente Kappa para la tabla microscopía*etanol	64
Tabla 10. Tabla de contingencia etanol*dicromato	64
Tabla 11. Coeficiente Kappa para la tabla etanol*dicromato de potasio	64
Tabla 12. Coeficiente Kappa para la tabla etanol*dicromato de potasio	65
Tabla 13. Evaluación de la prueba diagnóstica por biología molecular con muestras conservadas en dicromato de potasio.	65
Tabla 14. Evaluación de la prueba diagnóstica por biología molecular con muestras conservadas en etanol.	65

RESUMEN

Giardia lamblia es un protozoo de amplia distribución mundial, con alta prevalencia en países en vías de desarrollo, siendo considerado como uno de los principales causantes de infestaciones gastrointestinales y enfermedades diarreicas sobre todo en niños y en viajeros a áreas endémicas, la giardiasis al igual que otras parasitosis intestinales está asociada a problemas socio-económicos y sanitarios. El objetivo del presente estudio fue determinar el método diagnóstico más adecuado para la infección por este parásito en niños escolares de Ecuador. Se realizó coproparasitario simple y diagnóstico molecular de 414 muestras de heces de niños que se encontraban cursando el séptimo año de educación básica en las provincias de Pichincha, Loja, Los Ríos y Guayas. Las técnicas moleculares mostraron ser más sensibles que la microscopía óptica (n = 64 frente a n = 29). Se analizó y determinó el uso de dicromato de potasio 2.5% como el mejor conservante para muestras biológicas. En la población analizada se encontró una prevalencia total de giardiasis de 15,46%. Con una prevalencia por provincia de: 15% en Pichincha, 29,41% en Loja, 16,58% en Guayas y 10,64% en Los Ríos. No se encontraron relaciones entre la parasitosis y los factores socio-sanitarios analizados.

Palabras Clave: *Giardia lamblia*, giardiasis, diagnóstico molecular, PCR.

ABSTRACT

Giardia lamblia is a protozoan of global distribution, with high prevalence in developing countries, being considered as one of the main causes of gastrointestinal infections and diarrheal diseases especially in children and in travelers to endemic areas, giardiasis as well as other intestinal parasitosis is associated with socioeconomic and health problems. The objective of the present study was to determine the most appropriate diagnostic method for infection by this parasite in school children in Ecuador. A simple coproparasitology and molecular diagnosis of 414 stool specimens of children who were enrolled in the seventh year of basic education were carried out in the provinces of Pichincha, Loja, Los Ríos and Guayas. Molecular techniques showed to be more sensitive than optical microscopy (n = 64 versus n = 29). The use of 2.5% potassium dichromate as the best preservative for biological samples was analyzed and determined. A total prevalence of giardiasis of 15.46% was found in the analyzed population. With a prevalence by province of: 15% in Pichincha, 29.41% in Loja, 16.58% in Guayas and 10.64% in Los Ríos. No relationship was found between parasitic and socio-sanitary factors analyzed.

Keywords: Molecular Diagnosis, giardiasis, *Giardia lamblia*, PCR

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública debido a su difícil erradicación, ya que se acompañan de algunos factores ambientales y socioculturales difíciles de controlar, se establece la asociación entre la carga parasitaria y las condiciones socio-sanitarias (Organización Mundial de la Salud., 1992). Se ha demostrado que esta parasitosis es un problema global generalizado tanto en humanos como en animales (Vercruysse, 2005).

En Ecuador esta parasitosis está muy diseminada, y se puede encontrar en todos los pisos climáticos y en todos los estratos sociales.

Giardia lamblia es un protozooario, flagelado, bilateral, extracelular, anaerobio, binucleado, es un parásito piriforme que tiene una distribución global (Adam, 2001), el trofozoito tiene la capacidad de translación con movimientos lentos, vibratorios y rotatorios al mismo tiempo (Botero & Restrepo, 1998). Su ciclo de vida es simple, desde el trofozoito hasta el quiste, diferenciándose en: a) El enquistamiento que es necesario para su supervivencia en el ambiente externo y b) El desenquistamiento, necesario para la infección (Herrera, 2005).

Se estima que 200 millones de personas contraen la infección sintomática cada año. Sin embargo, la mayoría de las infestaciones son asintomáticas (López, 2012). La giardiasis crónica puede ser la causa de desnutrición, retraso del crecimiento y deterioro de las funciones cognitivas en la primera infancia (Ortega & Adam, 1997).

El uso de la tecnología convencional (microscopía directa) para el diagnóstico de muestras coprológicas, constituye una prueba con eficiencia limitada que para aumentar su sensibilidad se necesita realizar varias repeticiones de la lectura de placa por muestra, lo que consume grandes cantidades de tiempo y depende en gran medida de la experticia del observador; características que aumentan significativamente los costos de procesamiento, especialmente cuando se trata de estudios de prevalencia, por lo que en los últimos años hemos buscado y desarrollado técnicas más sensibles y no invasivas para la identificación y diagnóstico

de *Giardia lamblia*, diferenciándolo de organismos morfológicamente similares, tales como el uso de técnicas moleculares (Basuni, Mohamed, Ahmad, Zakaria, & Noordin, 2012).

La alta sensibilidad de las pruebas llevadas a cabo mediante biología molecular permite afrontar de manera eficaz problemas en el diagnóstico como la excreción esporádica del parásito en las heces y la baja carga parasitaria que a menudo acompaña a la infección, que en muchos casos retrasan el diagnóstico y complican la situación del paciente debido a tratamientos tardíos.

El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades parasitarias mediante la demostración de la presencia del parásito en diferentes nichos biológicos ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo (Asher, Waldron, & Power, 2012). La aplicación de técnicas como la PCR convencional, la PCR multiplex, la RT-PCR, la PCR en tiempo real y la secuenciación, revelan una alta sensibilidad y especificidad, lo que permite, en la práctica, no solo un rápido cribado en un gran número de muestras, sino también la identificación de género y especie, siempre y cuando se maneje un diseño adecuado de la técnica y de los controles de calidad (Baque, Gilliam, Robles, Jakubowski, & Slifko, 2011).

Partiendo del hecho de que las técnicas de biología molecular son reconocidas mundialmente por su alta especificidad y sensibilidad, este trabajo busca estandarizar e implementar estas técnicas para la identificación de *G. lamblia*, iniciando el proceso con la obtención del parásito de heces recogidas de niños que se encuentran en séptimo año de educación básica en 4 provincias de Ecuador y que han sido diagnosticados mediante coproparasitario simple como positivos para el protozoo estudiado y una vez recuperados los quistes, utilizarlos como control positivo para el proceso, posteriormente se diagnostica la presencia del parásito en heces, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, para el total de muestras recogidas y finalmente analizar estadísticamente los resultados obtenidos, a partir de los cuales se intenta evidenciar que la técnica de biología molecular es la más sensible y específica para identificar la giardiasis y si existen factores

relacionados que influyan en su prevalencia.

Hipótesis 1

H0: No hay variaciones en la sensibilidad y especificidad entre la PCR punto final y el diagnóstico por microscopía simple, es decir no existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos técnicas diagnósticas.

H1: Existen variaciones en la sensibilidad y especificidad entre la PCR punto final y el diagnóstico por microscopía simple, es decir, existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos técnicas diagnósticas.

Hipótesis 2

H0: Los factores sociodemográficos incluidos en el estudio no afectan a la variable de respuesta, es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de la infección.

H1: Al menos uno de los factores sociodemográficos incluidos en el estudio afectan a la variable de respuesta, es decir, existe diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de la infección.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la mayor sensibilidad y especificidad de la técnica de biología molecular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final frente a pruebas convencionales como el coproparasitario simple en heces de niños incluidos en el estudio procedentes de 4 provincias del Ecuador, determinando el mejor medio para transporte y conservación de la muestras de heces y dando a conocer la prevalencia de la giardiasis y su posible relación con las condiciones socio-económicas de la población valorada dentro del proyecto Estandarización e Implementación de Pruebas Moleculares para el Diagnóstico Temprano de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador que forma parte del Programa Nacional para el Manejo Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD).

Objetivos Específicos

1. Diagnosticar la presencia de *Giardia lamblia* por medio de microscopia simple, en heces frescas de niños de 4 provincias del Ecuador, incluidos en este estudio.
2. Definir el mejor preservante de ADN parasitario en heces trasladadas del campo al laboratorio en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5%, que permita un mejor diagnóstico molecular del parásito.
3. Detectar el ADN del parásito *Giardia lamblia* mediante PCR punto final en heces conservadas en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5%.
4. Determinar la prueba con mayor sensibilidad al comparar métodos de diagnóstico molecular versus métodos convencionales para el diagnóstico de *Giardia lamblia*.
5. Establecer si los factores sociodemográficos-sanitarios estudiados influyen en la prevalencia de la giardiasis en la población ecuatoriana incluida.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMÁTICA

1.1. Planteamiento del problema

Las infestaciones parasitarias han demostrado ser un problema histórico en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dice que más de una quinta parte de la población mundial está infectada con uno o más parásitos intestinales, por lo que la OMS considera que las enfermedades parasitarias son una causa importante de morbilidad, estrechamente relacionada con la pobreza y la contaminación del ambiente en el que se desarrollan las personas (Rodríguez, Geysen, Benítez, Geerts, & Brandt, 2002).

En Ecuador se conocen reportes aislados de parasitosis, ya que no existen estudios realizados a nivel nacional, sin embargo se estima que las enfermedades parasitarias afectan al 80% de la población rural y al 40% de la población urbano-marginal, afectando el desarrollo físico e intelectual de las poblaciones potencialmente vulnerables, como son los infantes (Jacobsen, Ribeiro, Quist, & Rydbeck, 2007; Mejia et al., 2013).

Actualmente los métodos diagnósticos de las parasitosis se basan frecuentemente en técnicas tradicionales de microscopía óptica, estas técnicas no son muy sensibles para el diagnóstico de infestaciones parasitarias, debido, entre otras cosas, a la baja carga parasitaria en la muestra biológica y a la fluctuación de las excretas parasitarias, errores que provocan la aplicación tardía del tratamiento específico y la recuperación tardía del paciente (Basuni et al., 2012).

En nuestro país existen estudios solo en poblaciones específicas que han identificado prevalencias locales de ciertos parásitos utilizando diferentes metodologías diagnósticas en cada protocolo. Por esta razón, se hace imprescindible disponer de datos sobre la prevalencia de las parasitosis a nivel nacional y que sean diagnosticados de forma homogénea, además de que sean obtenidos a partir de una muestra representativa de la población, para así conocer la prevalencia real y

establecer planes de tratamiento, prevención y control de la enfermedad, con mayor intensidad en las zonas más afectadas (Cho, Kim, & Park, 1990; Mejia et al., 2013).

La giardiasis es una parasitosis intestinal producida por *Giardia lamblia*, un protozooario enteropatógeno cosmopolita que infecta no sólo a los humanos, sino también a una amplia gama de mamíferos domésticos y salvajes (Feng & Xiao, 2011). Esta enteroparasitosis está ampliamente distribuida en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Este problema de salud pública ha hecho necesario desarrollar técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad en relación a las técnicas clásicas de diagnóstico clásico (microscopía óptica).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Ecuador es uno de los países cuya incidencia de parasitosis es alta, especialmente en las zonas rurales (Oña-Cisneros et al., 2015), el estudio de *Giardia lamblia* debe ser ampliado tanto como sea posible para conocer la distribución real y prevalencia de esta parasitosis así como para promover su mejor control. Para alcanzar este objetivo, es necesario utilizar nuevas técnicas que nos ofrezcan resultados fiables, evitando el diagnóstico con falsos negativos. Las técnicas diagnósticas basadas en la biología molecular han mostrado una alta sensibilidad (García-Cervantes et al., 2017), abriendo así un nuevo horizonte en la investigación en este campo, tanto para comprender mejor el ciclo de vida de este importante protozooario, así como también para prevenir y controlar las infestaciones generadas por este.

Los aspectos ambientales, establecen modificaciones en el grado de parasitosis. De las población afectadas por giardiasis, uno de los grupos que se considera más vulnerable es el de los escolares, causando diarrea crónica, dolor abdominal, síndrome de malabsorción y consiguiente deterioro del crecimiento y desarrollo tanto físico como intelectual, llegando incluso a tener un impacto en su rendimiento académico (Berkman, Lescano, Gilman, Lopez, & Black, 2002).

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedades Infecciosas

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos como virus, bacterias, parásitos y hongos, que pueden encontrarse en la tierra, en el aire o en el agua. Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra, o de un animal al hombre, como ocurre en el caso de las zoonosis (OMS, 2015).

Son consideradas como la segunda causa de muerte a nivel mundial (Butler et al., 2001), ya que causan aproximadamente 15 millones de muertes anuales (25% de todas las muertes a nivel mundial), y son la principal causa de muerte en los países subdesarrollados, ya que afectan principalmente a los niños y las poblaciones socialmente desfavorecidas (Restrepo, 2003).

Las enfermedades infecciosas que son la causa predominante de muerte en todo el mundo son las infecciones de las vías respiratorias inferiores, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las enfermedades diarreicas, la tuberculosis, el dengue, las enfermedades infecciosas en niños prevenibles por vacunación y la malaria (OMS, 2003).

Cabe señalar que su amenaza global depende de la prevalencia y las tasas de incidencia de las infestaciones conocidas, junto con las infestaciones emergentes que no han sido previamente reconocidas y las re-emergentes que se han reconocido anteriormente, pero que, aunque se cree que se han erradicado o controlado, han reaparecido con nuevas características epidemiológicas (López et al., 2012)

2.2. Enfermedades parasitarias.

Las parasitosis intestinales son infestaciones comunes en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo que presentan problemas de contaminación del agua y saneamiento deficiente (Haque, 2007). Se sabe que más de 300 especies de helmintos y 70 especies de protozoos son parasitarias para los seres humanos (Ruano et al., 2012).

Las parasitosis intestinales son infecciones causadas por parásitos, cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre (Cercado, 2013), están ampliamente distribuidas en todo el mundo, debido, entre otras cosas, a los fenómenos migratorios de la población que vive en zonas endémicas, hábitos e importaciones de alimentos (Cañavate, Cuadros, Martinez, & Martin, 2009).

Las enfermedades parasitarias presentan una alta prevalencia en el mundo (Cañavate et al., 2009), como consecuencia de ello, resulta ser una importante causa de morbilidad en la población, ya que alrededor de mil millones de personas son huéspedes de algunos tipos de parásitos (López et al., 2012), de los cuales un total de 450 millones de personas desarrollan la enfermedad causada por estos patógenos (Tulu, Taye, & Amsalu, 2014).

2.3. Epidemiología de las infecciones producidas por

Giardia lamblia.

G. lamblia es sinónimo de *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*, es un parásito protozoario flagelado y es una de las principales causas de diarrea en humanos en todo el mundo (Cacciò, Thompson, McLauchlin, & Smith, 2005).

Este parásito es más frecuente en los niños, causando diarrea crónica, dolor abdominal, síndrome de malabsorción, lo que resulta en disminución del crecimiento y desarrollo general (Herrera, 2005). La

giardiasis es la principal causa de enteritis epidémica en todo el mundo y se considera una enfermedad infecciosa re-emergente de preocupación en salud pública. En 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a la giardiasis en el grupo de enfermedades tropicales desatendidas (Savioli, Smith, & Thompson, 2006). En Asia, África y América Latina, 200 millones de personas están infectadas con *G. lamblia* y 500.000 nuevos casos se registran cada año. En los países desarrollados, las tasas de prevalencia oscilan entre el 2% y el 7% (Feng & Xiao, 2011). En los países en desarrollo, las tasas de prevalencia son superiores al 30% (Fletcher, Stark, Harkness, & Ellis, 2012).

Este parásito suele transmitirse de humano a humano (antroponótica) o de animal a humano (zoonótica) (Feng & Xiao, 2011). En animales de granja, por ejemplo, la giardiasis puede conducir a una alta morbilidad y consecuentes pérdidas económicas (M. E. Olson, O'Handley, Ralston, McAllister, & Andrew Thompson, 2004), aunque son frecuentes las infestaciones asintomáticas (Geurden, Vercruysse, & Claerebout, 2010). En los seres humanos, la giardiasis es generalmente una enfermedad autolimitada caracterizada por diarrea, cólico, dolor de cabeza, deshidratación, malabsorción, pérdida de peso y / o emaciación (A. G. Buret & Cotton, 2011), las infestaciones asintomáticas son frecuentes en individuos aparentemente inmunocompetentes (Farthing, Mata, Urrutia, & Kronmal, 1986; Haque et al., 2005; Patterson & Mason, 1987; Yaoyu & Xiao, 2011), sin embargo esta enfermedad afecta especialmente a los niños y a los individuos inmunocomprometidos (Muhsen & Levine, 2012; Stark et al., 2009; S. C. Thompson, 1994).

El diagnóstico de infección por *Giardia spp* se realiza generalmente mediante la identificación microscópica de quistes o trofozoítos en muestras fecales (Fletcher et al., 2012). Sin embargo, la identificación microscópica, aunque es específica, presenta una baja sensibilidad cuando los niveles de parásitos presentes son escasos y puede requerir muestras seriadas tomadas durante tres días (Huang,

White, Thomas, & al., 2006).

El uso de técnicas de biología molecular en estudios parasitológicos han permitido la identificación de especies de *G. lamblia* a través de la detección de polimorfismos en regiones específicas (loci específicos) y no específicas (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) del genoma de esta especie (Amar, Dear, & McLauchlin, 2003; Gonçalves et al., 2008; Robertson, Forberg, Hermansen, Hamnes, & Gjerde, 2007; Tellez, Winiiecka-krusnell, Paniagua, & Linder, 2003). Algunos genes, como los que codifican la subunidad ribosómica menor y otros que codifican ciertas enzimas del metabolismo basal, han demostrado una gran especificidad para la caracterización de este parásito (Monis, Andrews, Mayrhofer, & Ey, 1999; Tellez et al., 2003; Winkworth, Learmonth, Matthaei, & Townsend, 2008).

Como *G. lamblia* es capaz de infectar a los seres humanos, así como a una gran variedad de mamíferos, es la especie más importante dentro del género, a tal grado que la Organización Mundial de la Salud (OMS) le ha reconocido su potencial zoonótico. A través de una variedad de herramientas moleculares incluyendo el análisis de isoenzimas, reacción en cadena de polimerasa con análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), tipificación de cromosomas por electroforesis de campo pulsado y secuenciación de genes, *G. lamblia* ha demostrado ser un complejo de especies que comprende al menos siete genotipos, de los cuales se ha encontrado que los genotipos A y B infectan a la especie humana (Isaac-Renton & Sarafis, 1993; Meloni, Thompson, Strandén, Köhler, & Eckert, 1991).

El análisis de la molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) es una herramienta muy valiosa que ha permitido el diagnóstico de enfermedades y delineamientos aplicados a la investigación porque contiene toda la información necesaria para el desarrollo y la función de los organismos (Patricia, Velasquez, Del, Martinez, & Romero, 2009)

El ADN puede ser extraído de muchos tipos de materiales biológicos tales como sangre, tejido, hueso, entre otros, y el éxito de su análisis molecular depende de su adecuado aislamiento en términos de cantidad, calidad y pureza, de ahí que el objetivo de los protocolos de extracción es eliminar los inhibidores que impiden u obstaculizan dicho análisis (Fonseca, Arbelaez, & Contreras, 2010).

2.4. Características de la infección por el parásito *G. lamblia*.

La infección del hombre por *G. lamblia* tiene un carácter cosmopolita. Sin embargo, la endemidad de esta parasitosis es mayor en los países económicamente en vías de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente 1.000 millones de personas en estas naciones están infectadas con el protozoo. En Asia, África y América Latina, alrededor de 200 millones de personas desarrollan manifestaciones clínicas por giardiasis y 500.000 nuevos casos se reportan anualmente (Galindo & Almannoni, 2010).

2.4.1. Clasificación taxonómica

Giardia es un grupo de parásitos protozoarios distribuidos en todo el mundo, pertenecientes al Phylum Metamonada, Clase Trepomonadea, Orden Giardiida y Familia Giardiidae. Son eucariotas unicelulares que carecen de algunos compartimentos y cuyo ciclo de vida se extiende entre un estadio infectante y otro patógeno, el quiste y trofozoito respectivamente (Plutzer, Ongerth, & Karanis, 2010).

2.4.2. Descubrimiento del parásito *Giardia lamblia*

El primer parásito protozooario fue visto en 1681 por Anthony Van Leeuwenhoek en su rudimentario microscopio, en una muestra de su propia materia fecal que correspondía al flagelado *Giardia*. Este hallazgo no fue significativo para la medicina en ese momento y fue necesario el redescubrimiento por el patólogo checo Vilem Lambl, de la Universidad de Praga, profesor de patología, quien en 1859 vio el protozooario en la materia fecal gelatinosa de un niño. De este hallazgo el investigador hizo dos publicaciones e ilustró sus informes con varios dibujos de trofozoítos y quistes. Los comparo con renacuajos y les dio el nombre de *Cercomonas intestinalis*. Esto ocurrió 178 años después de que Leeuwenhoek enviara la carta a la Sociedad Científica. En 1879 Grassi encontró los mismos parásitos en ratones. Blanchard en 1885 observó parásitos similares en renacuajos y los llamó *Giardia agilis*, género que fue puesto en honor del zoólogo Alfred Giard que no tuvo nada que ver con el parásito. Blanchard en el mismo año reconoció a Lambl como el descubridor y llamo *Lambliia intestinalis*. Stiles en 1915 juntos los dos nombres y los llamo *Giardia lamblia*. La controversia persistió hasta 1952 cuando Filice propuso los nombres de *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*. Actualmente se aceptan las tres denominaciones (Botero & Restrepo, 1998).

2.4.3. Ciclo de vida

El proceso de diferenciación celular en *Giardia spp.* presenta dos transiciones de desarrollo principales: poco después de ser ingerido, el quiste sufre un proceso conocido como exquistación, en el que el parásito difiere de la forma móvil o trofozoíto. Luego, a partir de este estado móvil, se produce un segundo proceso llamado enquistación, mediante el cual el parásito se diferencia a quiste y puede pasar a las heces del huésped. El proceso de diferenciación de *G. lamblia* es uno de los procesos de desarrollo eucariota más primitivos y tiene la ventaja de que puede ser reproducido y estudiado completamente *in vitro* (Barash et al., 2017; Jerlström-Hultqvist, Ankarklev, & Svärd, 2010).

La infección del huésped comienza cuando se ingiere agua o alimentos contaminados con quistes. Luego, como resultado de la exposición de los quistes al pH ácido del estómago y a las enzimas pancreáticas quimiotripsina y tripsina, la exquistación comienza en el estómago y se completa en el duodeno. Simultáneamente, las proteasas de cisteína liberadas por el parásito ayudan a la degradación de la pared, permitiendo la liberación de los flagelos, lo que da lugar a una forma celular con características de transición morfológica entre el quiste y el trofozoíto real (Adam, 2001; Cueto & Feldman, 2006; Jerlström-Hultqvist et al., 2010; Luján & Svärd, 2011). En esta etapa, el parásito se reproduce asexualmente por fisión binaria, produciendo cuatro trofozoítos que, en comparación con los quistes, han aumentado el metabolismo, la expresión génica, el número de organelos secretores y la concentración de proteínas asociadas a la movilidad. Finalmente, los trofozoítos ensamblan el disco adhesivo que les permite unirse a las paredes del intestino delgado e invadir el duodeno (Cueto & Feldman, 2006; Jerlström-Hultqvist et al., 2010), donde encuentran una gran concentración de nutrientes que favorecen la proliferación. Por último, los parásitos se multiplican y se unen a las células epiteliales intestinales, causando síndrome de malabsorción (Luján, Mowatt, & Nash, 1997).

Debido a los movimientos en el intestino, algunos trofozoítos salen y entran en las porciones inferiores del íleon (Müller & von Allmen, 2005), donde el proceso de enquistamiento se produce debido al pH ligeramente alcalino y la presencia de sales biliares conjugadas a los ácidos grasos (Adam, 2001; Cueto & Feldman, 2006), que hacen que la concentración de colesterol disminuya en el medio. En esta fase de enquistación, uno de los procesos clave es la biogénesis de la pared, que está muy coordinada y se puede dividir en tres etapas: I) recepción del estímulo de enquistación y regulación de la expresión de los genes específicos del proceso; II) transporte intracelular y secreción de proteínas de la pared del quiste, y III) montaje extracelular de la pared en la superficie del trofozoíto enquistante (Luján et al., 1997). Por último, los quistes se excretan en las heces y pueden contaminar el agua y los alimentos que, cuando se consumen, infectarán a otro huésped, completando el ciclo de vida del parásito (Atias, 2001a)

2.4.4. Morfología

Giardia spp. biológicamente puede tener dos formas: trofozoíto y quiste. El trofozoíto (figura 1) es móvil, de configuración piriforme a oval, con simetría bilateral y con dimensiones de 12-15 / 6-8 micras.



Figura 1. Trofozoíto de *Giardia lamblia* (Microscopía Electrónica de barrido): CDC.<http://www.cdc.gov/parasites/giardia>

Tiene una superficie dorsal convexa y un gran disco adhesivo ventral (utilizado para adherirse a la pared del duodeno por succión). La célula es binucleada, con cuatro pares de flagelos y un par de cuerpos medios delineados.

Los quistes tienen una pared hialina delgada y dimensiones de 8-12 / 7-10 micras en forma oval como se muestra en la figura 2. Inicialmente son binucleados y varias estructuras que comparten con el trofozoíto, de los cuales el axostilo es notorio (Lujan, 2006). Se piensa que *Giardia* proviene de organismos unicelulares primitivos, debido a que tiene una organización intracelular simple y carente de mitocondrias y peroxisomas (Simpson et al., 2002). Es por eso que *Giardia* juega un papel importante en la elucidación de la evolución de los eucariotas.

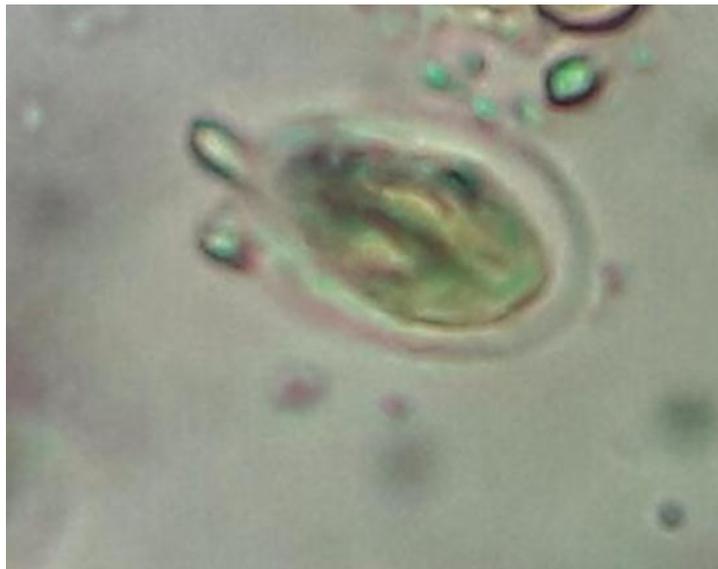


Figura 2. Quiste de *Giardia lamblia* de muestra biológica colectada en Atacames – Esmeraldas el 15/07/2017 (100X). Programa PROPAD.

2.4.5. Patología

La patogénesis de la giardiasis no se ha investigado completamente. *Giardia lamblia* vive y se reproduce asexualmente en la superficie del intestino delgado del huésped. Según los estudios más recientes, la giardiasis es un complejo de alteraciones fisiopatológicas. Una de ellas es la permeabilidad modificada de los

enterocitos resultante del efecto fitopatológico de los metabolitos del parásito (Buret, Mitchell, Muench, & Scott, 2002a; Buret, Scott, & Chin, 2002b), se destruyen las proteínas de la membrana periférica, en particular la zonula ocludina 1 (ZO-1), que son importantes para la regulación de la permeabilidad epitelial. Como resultado, el borde enterocítico queda dañado, la permeabilidad del epitelio aumenta, dando como resultado inflamación y problemas gastrointestinales (Buret, Scott, et al., 2002).

G. lamblia también desencadena la apoptosis causando la pérdida de la función de la barrera epitelial con el consecuente aumento de la permeabilidad, y la apoptosis. La gravedad de la enfermedad también se determinan por la condición fisiológica e inmunológica del huésped (A Buret et al., 2002). Se ha establecido que el aumento de la permeabilidad intestinal también podría ser el resultado de un aumento de los antígenos lumbinales, esto podría conducir a reacciones alérgicas, una complicación observada en los seres humanos infectados con *Giardia* (Buret, Scott, et al., 2002; Chakarova, 2004; Chakarova, Miteva, & Stanilova, 2009).

La variabilidad de la patología causada por la giardiasis depende tanto del parásito como del huésped. Su variabilidad se manifiesta en los síntomas, signos clínicos y en la gravedad de la enfermedad. Los cambios fisiopatológicos descritos podrían encontrarse en la mayoría de los huéspedes infectados, pero sus consecuencias pueden variar según el modo de nutrición, el estado inmunitario y las infestaciones intestinales acompañantes. La giardiasis crónica en niños desnutridos infectados con otros parásitos como *Hymenolepis* o *Ancylostoma* es un factor primario para el desarrollo deficiente (Sackey, Weigel, & Armijos, 2003; Thompson, 2002). En animales jóvenes con mala nutrición, sobrepoblación o estrés por baja temperatura, la giardiasis podría ser un factor adicional para una enfermedad grave. Se cree que podría ser la causa de la mortalidad encontrada en los polluelos de ibis (McRoberts et al., 1996).

2.4.6. Epidemiología

La giardiasis es una infección cosmopolita y está ampliamente distribuida en todas las latitudes y continentes, especialmente en climas templados y húmedos. Ocurre muy frecuentemente en la población infantil, personas internadas en orfanatos o prisiones que generan hacinamiento, homosexuales (transmisión sexual) y viajeros (Atias, 2001a; Rivera, Parte, Hurtado, Magaldi, & Collazo, 2002). *G. lamblia* es el parásito más común en el mundo y está incluido entre los 10 parásitos intestinales más prevalentes. (Buret, 2005; Farthing, 1994)

En los Estados Unidos, *G. lamblia* se ha descrito como el protozoo entérico más comúnmente diagnosticado, con reservorios de agua donde se han encontrado quistes parasitarios, especialmente en suministros de agua donde no se incluye filtración previa (Lebwohl, Deckelbaum, & Green, 2003). En México, las tasas de infección de este parásito varían ampliamente, de 1 a 60% de la población estudiada (Ruiz-Palacios et al., 2000).

La incidencia está estrechamente relacionada con las condiciones de salud, la vivienda, la higiene personal y el nivel educativo (Rivera et al., 2002). En la giardiasis humana, el papel de la transmisión animal no está del todo claro, pero se sabe que el gran riesgo de transmisión zoonótica está asociado con animales de compañía como perros y gatos (Thompson, 2004).

2.4.7. Genotipaje de *Gardia lamblia*

Gardia lamblia se ha descrito en seres humanos, así como en otros mamíferos domésticos y salvajes (Cacciò & Ryan, 2008). Algunos estudios recientes han sugerido que esta especie debe ser considerada como un complejo de especies cuyos miembros, aunque morfológicamente idénticos, tienen variaciones genéticas que le han permitido dividirse en al menos ocho genotipos (de A a H) (Lebbad et al., 2011).

Se ha demostrado que en la mayoría de los casos sólo los genotipos A y B están asociados con la infección en humanos (Cacciò, De Giacomo, & Pozio, 2002), aunque se han reportado casos de zoonosis en personas infectadas con genotipos específicos de ganado, perros y gatos (Soliman, Fuentes, & Rubio, 2011). Los genotipos C a H parecen ser específicos del huésped, ya que C y D se han reportado principalmente en los canidos (domésticos y silvestres), E está fuertemente relacionado con los ungulados, F y G se han detectado en los gatos (Cacciò & Ryan, 2008) y el genotipo H se asocia con mamíferos marinos, aunque recientemente se describió en focas grises y en una gaviota austral (Lasek-Nesselquist, Welch, & Sogin, 2010).

La caracterización directa de los quistes de *G. lamblia* mediante la técnica de PCR se ha utilizado para aclarar el papel zoonótico de los diferentes genotipos (Lalle et al., 2005). El genotipo A puede dividirse en al menos tres subgrupos: el primero (AI), detectado en humanos y en animales, tiene un mayor potencial zoonótico; (AII), observada principalmente en humanos, y la tercera (AIII), aparentemente específica de la especie, ha sido aislada de ungulados silvestres. (Cacciò, Beck, Almeida, Bajer, & Pozio, 2010)

El genotipo B comprende dos subgrupos reconocidos, BIII y BIV, que se han asociado principalmente con seres humanos, aunque también hay algunos informes en animales (Read, Monis, & Thompson, 2004; Sprong, Cacciò, van der Giessen, Sterling, & Adam, 2009) Sin embargo, en comparación con A, este genotipo presenta un gran polimorfismo, lo que conduce a la existencia de muchos más subtipos (Yaoyu & Xiao, 2011).

Se sugiere que los genotipos A y B corresponden a dos especies diferentes, ya que los estudios genómicos han demostrado que sólo existe un 77% de identidad de nucleótidos y un 78% de identidad de aminoácidos en las regiones codificantes, lo que corrobora las diferencias biológicas encontrados en infecciones experimentales, crecimiento de cultivos y citogenética (Jerylström-Hultqvist et al., 2010).

2.5. Pruebas diagnósticas.

2.5.1. Coproparasitario simple.

El examen coproparasitario es un conjunto de técnicas diagnósticas que constituyen la indicación metodológica para la identificación de la mayoría de las enteroparasitosis motivadas por protozoos o helmintos. Su eficacia y sensibilidad para establecer un diagnóstico correcto depende de la adecuada indicación y preparación de la muestra, los datos clínicos y la historia de interés que se proporcionan al laboratorio y su correcta y completa ejecución con examen microscópico directo, enriquecimiento y examen macroscópico final. Otras técnicas complementarias (coloraciones, enriquecimientos especiales, etc.) contribuyen a completar el esquema del examen en circunstancias específicas (agentes oportunistas, emergentes, exóticos o endémicos) (Agrello & Eirale, 1996).

2.5.2 Técnicas de Flotación y sedimentación.

Una de las maneras de diagnosticar las enfermedades parasitarias del tracto gastrointestinal y las glándulas asociadas es mediante la aplicación de técnicas coproparasitológicas de enriquecimiento (sedimentación y flotación), que permiten concentrar huevos, quistes y larvas en menor volumen de heces, para determinar su presencia e identificarlos correctamente. La recuperación de estas formas parasitarias plantea un problema de difícil solución para cada microscopista. Si bien es posible preparar frotis fecales a partir de heces frescas o material fecal preservado en SAF o formol, los métodos de concentración permiten que los quistes protozoarios y otros parásitos no pasen desapercibidos cuando están presentes en pequeñas cantidades. Con el fin de maximizar la eficiencia en la detección de parásitos intestinales, se recomienda el uso de ambos métodos de diagnóstico (Orihel, Ash, & Ramachandran, 1997).

2.5.2.1. Las técnicas de sedimentación.

Se utilizan para la observación de quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos, pero la desventaja de estas técnicas es que las preparaciones contienen más residuos que los procesados por flotación. En este caso, se utiliza acetato de etilo para extraer residuos y grasas de las heces y llevar los parásitos al fondo de la suspensión. Estas técnicas son recomendadas porque son fáciles de realizar, tienen baja probabilidad de errores técnicos y recuperan una amplia gama de organismos (Atias, 2001).

2.5.2.2. Las técnicas de flotación.

Permiten la separación de protozoos y quistes de ciertos helmintos de exceso de residuos mediante el uso de soluciones con alta densidad. Los elementos parásitos se recuperan de la capa superficial y los residuos se mantienen en la parte inferior del tubo. Con estas técnicas las preparaciones son más limpias que las obtenidas por sedimentación. En la flotación también se observa el fondo del tubo para asegurar la recuperación de todos los organismos posibles (Truant, Elliott, Kelly, & Smith, 1981).

2.5.3. PCR en tiempo real

La PCR es el método de amplificación de secuencias diana más frecuentemente utilizado. De estas variantes, la técnica de PCR en tiempo real se ha introducido en los últimos años en el diagnóstico molecular de infecciones como una herramienta para la determinación cuantitativa de la carga infecciosa, así como para el diagnóstico de la infección. La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo utilizando moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN bicatenario tal como SYBR Green o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas: sondas Taqman, cebadores fluorescentes o beacons moleculares y sondas de hidrólisis, aumentando así la especificidad de la reacción (Cortázar & Rincón, 2004). La sonda Taqman es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en ambos extremos y es capaz de hibridarse en regiones internas y específicas de los productos de PCR. El fluorocromo en el extremo 5' se llama "reporter" y el extremo 3', se denomina "quencher". Cuando se integra la sonda, que se incluye en la reacción de PCR junto con los cebadores, la proximidad del "reporter" y del "quencher" provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) que da como resultado la cancelación de la fluorescencia de la sonda. En el transcurso de la PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando está presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa, que permite que los nucleótidos se eliminen específicamente del extremo 5' de la cadena de ácido nucleico, provoca la liberación del "reporter" desde el extremo 5' de la sonda que, cuando se separa del "quencher", comienza a emitir fluorescencia (Walker, 2002).

2.5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR punto final)

La PCR punto final es una técnica que permite generar un gran número de copias de un fragmento de ADN. El requisito fundamental para llevar a cabo la reacción es tener fragmentos cortos de ADN monocatenario complementario de los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción, la cantidad de fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas simples de separación de fragmentos de ADN (Crespo, 2006). La sensibilidad analítica es relativamente alta con un número mínimo de 100 a 1000 copias de ADN detectable, que puede mejorarse optimizando la prueba y seleccionando adecuadamente los cebadores y el ADN diana (OIE, 2012).

Este es un método utilizado para la detección directa de ADN del agente infeccioso, lo que es prometedor en el caso del análisis de microorganismos difíciles de diagnosticar (OIE, 2012). Por lo tanto, es una técnica que permite determinar la presencia o ausencia de un agente infeccioso en una muestra biológica. La sensibilidad de la PCR puede variar debido a la región genética que se elige para amplificar y el número de copias presentes en el genoma del microorganismo. Por lo tanto, se debe trabajar con el marcador genético que posee la mayor especificidad y sensibilidad (Caicedo et al., 2017).

2.6. Tratamiento.

Existen varios fármacos disponibles para tratar la giardiasis en seres humanos. Estos incluyen los siguientes: Metronidazol, Tinidazol y Furazolidona (perteneciente al grupo de los nitroimidazoles), Albendazol (un bencimidazol) y Quinacrina (un sustituto de acridina). La utilidad de Paromicin también se ha demostrado en algunas situaciones y Nitazoxanida se ha propuesto como alternativa a nitroimidazoles convencionales; Sin embargo, es imprescindible llevar a cabo estudios adicionales para evaluar completamente su eficacia

(Gonen, Yilmaz, Yalcin, Simsek, & Gonen, 2007; Monis & Thompson, 2003; Savioli et al., 2006; Wright, Dunn, Upcroft, & Upcroft, 2003). Sin embargo, en la actualidad, los nitroimidazoles (Metronidazol y Tinidazol) y el Albendazol son los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Giardia lamblia* (Savioli et al., 2006).

Es importante señalar que aunque los fracasos terapéuticos se han descrito con todos los fármacos actualmente utilizados, todavía no ha sido demostrado de manera convincente si se trata de casos de resistencia (Monis & Thompson, 2003; Savioli et al., 2006). La falta de cumplimiento del paciente y los efectos secundarios pueden conducir a fracasos terapéuticos; además, se dispone de algunos datos sobre la sensibilidad variable entre las diferentes cepas de *G. lamblia* (Gonen et al., 2007; Monis & Thompson, 2003; Savioli et al., 2006).

Las dosis únicas diarias conducen a un mejor cumplimiento del tratamiento (el Tinidazol tiene una vida media más larga que el Metronidazol y es bien tolerado si se ingiere durante las comidas) (Savioli et al., 2006); el incumplimiento puede ocasionar resistencia farmacológica y, aunque hay evidencia anecdótica de resistencia a Metronidazol, estudios adicionales sobre los mecanismos genéticos de resistencia y sensibilidad a Metronidazol asociados con los conjuntos, así como el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos (Savioli et al., 2006). El Albendazol ofrece una alternativa más aceptable a los nitroimidazoles, especialmente en los niños, sin embargo, es necesario administrarlo en varias dosis (Savioli et al., 2006; Wright et al., 2003).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Aspecto ético legal.

El Programa Nacional para el Manejo Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en Ecuador (PROPAD) y su proyecto Estandarización e Implementación de Pruebas Moleculares para el Diagnóstico Temprano de Parasitosis Desatendidas en Ecuador fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Central del Ecuador en 2012. Los niños incluidos en este estudio y sus padres o sus respectivos representantes legales fueron informados de esta investigación y los procedimientos a llevar a cabo a través de un taller realizado por un grupo de psicólogos.

3.2. Consentimiento informado y encuesta.

Los representantes legales de los niños seleccionados, fueron informados de la investigación, sus objetivos, importancia, posibles riesgos, beneficios, toma de muestras biológicas, confidencialidad de datos de los participantes y que podían abandonar el estudio en cualquier momento. El padre o representante legal de cada niño, después de participar en el taller informativo y luego de un proceso de comprensión y aceptabilidad del estudio, fue invitado a firmar el respectivo consentimiento informado (Anexo 2) y llenó una encuesta que proporcionó datos del paciente y de los factores sociodemográficos que pudieron influir en la posible infección, el procedimiento fue efectuado de manera libre y voluntaria. Los consentimientos obtenidos se encuentran archivados en las oficinas del programa PROPAD, ubicado en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr Leopoldo Izquieta Perez INSPI-LIP, en la ciudad de Quito en las calles Iquique N14-285 y Yaguachi, bajo custodia del proyecto “Determinar la Prevalencia General de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador Protozoarios y Helminetos”

3.3. Instituciones.

El presente proyecto de titulación fue desarrollado como parte del Proyecto “Estandarizar e implementar ensayos de pruebas moleculares para el diagnóstico y profilaxis tempranas de las parasitosis desatendidas del Ecuador”, que es uno de los cinco proyectos que conforman el Programa Nacional para el abordaje multidisciplinario de las Parasitosis desatendidas en el Ecuador (PROPAD), el cual fue financiado por la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT y es ejecutado el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-LIP y la Universidad Técnica Particular de Loja.

3.4. Zona de Estudio y número de muestras analizadas.

El Programa Propad tiene su n muestral, basada en datos de todo el Ecuador continental, a partir de esta determinación se escogieron para este trabajo pacientes incluidos en el programa que aceptaron firmar el consentimiento informado y la colecta de muestras biológicas de las Provincias de Pichincha (cantón Quito, 2680 m.s.n.m.), Loja (cantón Puyango, 1380 m.s.n.m), Guayas (cantones: El Empalme, 74 m.s.n.m., Guayaquil 15 m.s.n.m., Naranjito 160 m.s.n.m) y Los Ríos (cantones: Buena Fe 100 m.s.n.m, Pueblo Viejo 10 m.s.n.m). Dando un total de 482 muestras analizadas.

3.5. Periodo de investigación.

La toma de muestras se realizó en el año 2014 entre los meses de junio y julio, el análisis molecular se realizó en el año 2016 - 2017 entre los meses de Julio - Febrero.

3.6. Metodología para la colecta de muestras biológicas.

La recepción de muestras biológicas se realizó en dos fases:

3.6.1. Acercamiento previo a las escuelas.

Un grupo de psicólogos ejecutó las actividades logísticas para reconocimiento de ubicación geográfica y medios de acceso a las instituciones incluidas y posteriormente realizaron el acercamiento previo a los directores de las escuelas a visitar, a sus maestros y a los padres de familia, con el fin de socializar la propuesta de investigación y contar con la participación activa de la comunidad, por medio de talleres informativos. En donde además se solicitó a los padres y tutores legales firmar el consentimiento informado siguiendo las normas de bioética internacionales, para estudios de este tipo.

3.6.2. Talleres informativos sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de parasitosis

Se brindaron los respectivos talleres a los padres, representantes legales y profesores de los niños dando a conocer las alteraciones que produce la parasitosis, la importancia de prevenir esta patología y como evitarla con actividades cotidianas simples. En estos talleres se solicitó la firma del consentimiento informado, además del desarrollo de una encuesta donde se solicitó información de diferentes factores socioeconómicos. Cuando se aceptó la participación del escolar con la firma del consentimiento y el llenado de la encuesta se colocó un código numérico establecido por el programa Propad para identificación.

3.6.3. Toma de muestras biológicas.

Un equipo compuesto por médicos, laboratoristas clínicos y ramas afines visitó cada escuela en la hora de ingreso de los alumnos, procediéndose a tomar distintos valores antropométricos de los niños incluidos en el estudio como: peso, talla, perímetro de cintura y perímetro braquial. Posteriormente se recolectaron las muestras de heces etiquetándolas con la codificación indicada en el consentimiento correspondiente.

3.6.3.1. Obtención y manejo de muestras biológicas de heces

Los alumnos habían sido orientados a la colecta y entrega de las muestras de heces a la hora de entrada al establecimiento educativo, para realizar este proceso se tomó en cuenta los siguientes detalles:

3.6.3.1.1. Factores condicionales de la muestra

Existen factores pre-analíticos perfectamente controlables (dieta, medicación, ayuno) que en la práctica, el proceso de recolección de las muestras en casa, debe considerar estos cuidados, sin los cuales las muestras pueden verse afectadas considerablemente en su calidad y por lo tanto en los resultados. Así también existen factores fisiológicos que varían de paciente a paciente, como edad, sexo, menstruación, embarazo entre otros, que deben tomarse en cuenta al obtener una muestra para el laboratorio, todo perfectamente controlable con buena información del paciente. La identificación de estas variantes puede ayudar a asegurar y minimizar los errores que existen al realizar el proceso analítico. Es importante tener en cuenta todos estos aspectos que pueden interferir con los resultados de calidad (Cases & Ríos, 1995).

3.6.3.1.2. Preparación del paciente

- No existió ninguna limitación con respecto a la dieta y el ayuno previo para la obtención de las muestras de heces en este caso, ya que los exámenes a realizarse no requieren que se cumpla esta restricción, puesto que estas fueron tomadas en campo.
- En caso necesario se interrogó al paciente para tomar en cuenta algunos datos como (edad, ingesta de medicamentos, algún tipo de patología) para la interpretación de los resultados en el laboratorio.

- La ingesta de laxantes pueden cambiar la concentración de parásitos encontrados en una muestra de heces.

3.6.3.1.3. Consideraciones especiales previas a la colecta de muestra.

- Previo a la colecta se entregó un envase plástico, estéril a cada padre o representante legal del escolar que acepto firmar el consentimiento informado.
- El día de la colecta, se examinó y verificó que el código, el consentimiento informado y la encuesta concuerde con el paciente del que se recibió la muestra de heces.
- Se identificó el contenedor de la muestra con el código interno del programa PROPAD.

3.6.3.1.4. Área de colecta y procesamiento de muestras

El área o espacio físico para colecta y procesamiento de muestras; debido a que el Programa Propad, cuenta con un laboratorio móvil para análisis *in situ*, este espacio fue proporcionado por el establecimiento o institución visitada, el cual fue nominado como laboratorio Base y fue determinado días antes de la llegada del equipo técnico al sitio de colecta dentro de las actividades logísticas previas a la llegada del equipo técnico del programa. En el espacio destinado se realizó habilitaciones para asegurar que las medidas de bioseguridad posibles estuvieren presentes, entre las cuales estuvo; área de separación de desechos, tanto infecciosos, comunes y cortopunzates para lo que se destinó recipientes con o fundas con colores y según normativa internacional (Organización Mundial de la Salud, 1992).

3.6.3.1.5. Colecta de muestra

Se pidió al paciente recoger la muestra de preferencia en

primera horas de la mañana al levantarse, en el recipiente limpio y libre de orina. La muestra se recogió en un envase plástico, estéril de boca ancha. Se solicitó se recolecte una cantidad de 50 a 80 g. de heces, esto para que exista una cantidad suficiente de muestras para realizar las técnicas establecidas para el estudio como son: copro-parasitario simple y las alícuotas en conservantes para el análisis molecular, si la toma de la muestra por parte del paciente, se realizó en la noche debido a las condiciones fisiológicas propias, se solicitó refrigerarla, mas no congelarla de acuerdo a técnicas recomendadas por (Organización Mundial de la Salud, 1992). Se indicó al escolar que previo a la recolección, se abstenga de: tomar medicamentos antibióticos, purgantes aceitosos, antiparasitarios por lo menos tres meses previos al examen. Si algunos de estos aspectos no se tomaba en cuenta el escolar era excluido del estudio.

3.6.3.1.6. Horario de colecta

Se colectaron las muestras de heces preferentemente a primeras horas de la mañana 7:00H, las muestras fueron entregadas por los escolares en el área de recepción del laboratorio implementado, ubicado en la entrada del espacio asignado por la institución visitada.

3.6.3.1.7. Alícuotas y conservación de muestras biológicas (heces)

Con palillos de dientes se tomaron dos alícuotas por cada muestra de heces, estas fueron conservadas para su transporte en viales de 1.5mL con 1 mL de etanol al 70% y dicromato de potasio al 2.5% respectivamente, y a su llegada al laboratorio se los conservó a -80°C en los congeladores del proyecto Pruebas Moleculares del programa PROPAD, localizados en la planta baja (cuarto de congeladores) del edificio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI-Leopoldo Izquieta Pérez-Regional Norte, ubicado en la ciudad de Quito: Iquique N14-e285 y Yaguachi – El Dorado, provincia Pichincha.

3.6.3.1.8. Transporte de muestras refrigeradas.

Las muestras fueron recolectadas en los coolers destinados para este proceso (figura 3), y fueron transportadas hasta el área de procesamiento en el laboratorio base, el procesamiento se realizó en el menor tiempo posible a partir de la colecta, tomándose como referencia que mientras el tiempo avanza, algunas de las estructuras parasitarias tienden a desaparecer (Montoya, Bengoa, & Pinillos, 2005).

Para transportar las heces al laboratorio central en Quito, se empacaron las muestras para ser enviadas, siguiendo cadena de frío entre un sitio y otro dentro del país por vía terrestre, cumpliéndose con las siguientes condiciones:

- Se verificó que las muestras estén correctamente identificadas. Siempre se utilizó un marcador resistente al agua o en su defecto un lápiz de cera para identificarlas. Cuando se humedecen las muestras y se ha usado un marcador soluble en agua se pierde la identificación y con ello el trabajo realizado.
- Los tubos con capacidad de 1.5 mL utilizados para alícuotas de heces tienen espacios para identificar la muestra con el código correspondiente. Se verificó que los tubos se encuentren bien cerrados, estos fueron conservados en cajas térmicas resistentes, empaquetándolas con relleno de papel, plástico o virutas de anime para amortiguar los golpes. Como medio ideal de preservación se utilizó refrigeración con gel refrigerante. La caja externa se cerró de tal manera que las esquinas y/o tapas quedan selladas con cinta adhesiva.

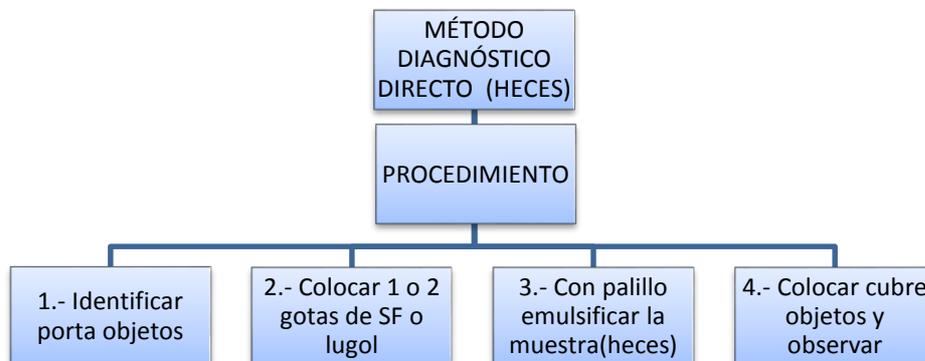


Figura 3. Conservación de muestras con gel refrigerante.

3.7. Procesamiento de muestras biológicas.

3.7.1. Examen microscópico de preparaciones húmedas.

La preparación en húmedo es una técnica sencilla y fácil para examinar heces, la cual es mayormente empleada por su facilidad y bajo costo. La preparación húmeda se puede realizar con solución salina o con lugol (solución yodada) esta se utiliza para observar tanto huevos como larvas, se emplea en la mayoría de los casos solución salina (JCarbonell & Fernández-Alonso, 1996). Como se puede visualizar en el flujograma del proceso a continuación.



Flujograma del proceso del coproparasitario simple utilizado en muestras de heces colectadas de escolares incluidos en el estudio provenientes de escuelas de 4 provincias del Ecuador continental

3.8. Población.

La población de estudio incluyó a 414 niños de séptimo año de educación básica y que pertenecían a las provincias de Pichincha, Loja, Los Ríos y Guayas, la selección de participantes se realizó mediante un muestreo al azar a partir de la población seleccionada estadísticamente en el programa PROPAD.

3.9. Tipos de Estudio.

Es un estudio, descriptivo de prevalencia, observacional y transversal, en el que se tomaron los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión / Exclusión

Fueron incluidos o excluidos de este estudio los niños escolares de escuelas de 4 provincias de Ecuador continental basados en los siguientes términos:

Tabla 1. Términos de inclusión y exclusión para los participantes.

Inclusión	Exclusión
Niños escolares de séptimo año de educación básica que pertenecen a escuelas fiscales, tomadas de la <i>n</i> muestral del programa Propad.	Niños escolares que se encuentren cursando cualquier otro año de educación básica en las escuelas fiscales de las 4 provincias ecuatorianas incluidas para este estudio.
Edad de los participantes: mínima 6 años, máxima 15 años	Edad de los participantes: menores de 6 años y mayores de 15 años
Participación voluntaria, confirmada con la firma del consentimiento informado por parte del padre o representante legal.	Niños cuyos representantes legales no firmen el consentimiento informado, no entreguen muestra o con información incompleta.
Escolares que al momento del estudio no estuvieren en ningún tratamiento como toma de antibióticos, purgantes aceitosos.	Escolares que al momento del estudio estuvieran en tratamiento con antibióticos, purgantes aceitosos.
Escolares que no estén en tratamiento con antiparasitarios por lo menos tres meses previos al examen.	Escolares que estén en tratamiento con antiparasitarios o que hayan tenido este tratamiento 3 meses previos a la colecta.

3.10. Controles Positivos.

Con el objetivo de obtener controles positivos para el análisis molecular de *Giardia lamblia*, se realizó el aislamiento del parásito a partir de heces con diagnóstico positivo mediante microscopía.

3.10.1. Protocolo de flotación de quistes de *Giardia lamblia* con sulfato de zinc a partir de muestras biológicas - heces fecales.

Se conoce como técnica de Faust, ya que fue el quien la diseñó para helmintos en 1938. En este estudio, se utiliza este método para un protozooario con buena obtención parasitaria.

3.10.1.1. Fundamento.

Mediante este método se utiliza la solución de Zn, cuya densidad específica es de 1,180 (33%), que forma un medio de mayor densidad que la de los quistes parasitarios, facilitando que éstos con menos peso específico que la solución, se concentren y floten. La concentración adecuada recomendada es la que utiliza como reactivo una solución acuosa de sulfato de Zn al 33% con una densidad de 1.180. El agua utilizada diluye y lava las heces. La filtración con gasa plegada evita que los restos gruesos penetren en las paredes, la centrifugación enriquece en delgada película la superficie del líquido centrifugado con los quistes livianos (Tobie et al., 1938).

3.10.1.2. Procedimiento.

Homogenizamos 5 gr. de la muestra de heces, con agua destilada, con ayuda de una paleta bajalenguas hasta obtener un líquido homogéneo, doblamos 4 veces la gasa y formamos un embudo sobre un frasco de orina estéril, colocamos la muestra de heces sobre la gasa y filtramos. Con la ayuda de una pipeta pasteur, colocamos la muestra filtrada en un tubo de ensayo debidamente etiquetado, aforamos el tubo de ensayo con agua destilada, centrifugamos durante 2 minutos a 2500 r.p.m. y descartamos el sobrenadante, repetimos los lavados por dos ocasiones más. Colocamos en el sedimento del tubo de ensayo, 4

ml. de sulfato de zinc, diluido al 33%, con una densidad de 1.18, centrifugamos durante 2 minutos a 2500 r.p.m, separamos la capa superior que es donde se encuentran los quistes purificados.

3.11. Extracción de ADN de parásito puro.

El aislamiento de ADN se estandarizó en base al protocolo de MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para tejido fresco o congelado, que utiliza perlas magnéticas, con varias modificaciones: se pesó 50 mg de extracto de parásito puro en un tubo con capacidad de 1.5 mL, se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) centrifugando por 5 minutos a 14000 r.p.m. a 4°C. se retiró con una pipeta el sobrenadante teniendo cuidado de no dañar el pellet generado al fondo del microtubo, se añadió 250 µl de PBS 1X, se añadió 20µl de solución PK, bien mezclado, al centro del tubo, y evitando tocar los lados del microtubo mientras se pipetea, se mezcló suavemente girando el tubo teniendo cuidado de no permitir que cualquiera de las muestras de solución / PK queden atrapados en la tapa del microtubo, se cerró el tubo y se mezcló por vórtex durante 15 segundos, se agregó 200µl de tampón de lisis bien mezclado al microtubo, se mezcló bien por vórtex hasta obtener una mezcla homogénea, (aproximadamente 15 segundos), se incubo en baño maría a 56°C durante 2 horas usando un flotador de espuma, se quitó el tubo del baño maría y se secó el exterior del tubo con un papel de toalla, se añadió 20uL de *MagaZorb Reagent* (perlas) el cual fue homogenizado por vórtex, se añadió 200 uL de binding buffer homogenizado por vortex, se incubo al ambiente por 10 min. mezclando manualmente cada 2 min, se colocaron los tubos en la gradilla magnética y se dejó reposar por 3 minutos, se retiró la fase líquida generada teniendo cuidado de no tomar las perlas pegadas al magneto en la pared lateral del microtubo, se retiró el tubo de la gradilla magnética, se añadió 500uL de *Wash Buffer* y se homogenizo por vortex hasta suspender todas las partículas, se colocó en la gradilla magnética dejando reposar durante tres minutos y se retiró la fase líquida sujetando el tubo firmemente contra la gradilla procurando retirar todo el líquido tanto del tubo como de la tapa, se

realizó dos lavados adicionales con 500 μ L de Wash Buffer para remover las proteínas y remanentes de contaminantes. Se añadió 100uL de *Elution Buffer* y se homogenizó las perlas manualmente, se incubó durante 10 minutos en baño maría a 56°C, se colocaron las muestras en la gradilla magnética durante tres minutos y se extrajo la fase líquida en cantidades pequeñas hasta trasvasar en un nuevo tubo estéril debidamente etiquetado. En la Figura 4 se puede visualizar la sedimentación de las partículas magnéticas luego de un lavado. Al finalizar, el ADN se almacenó a -20°C.

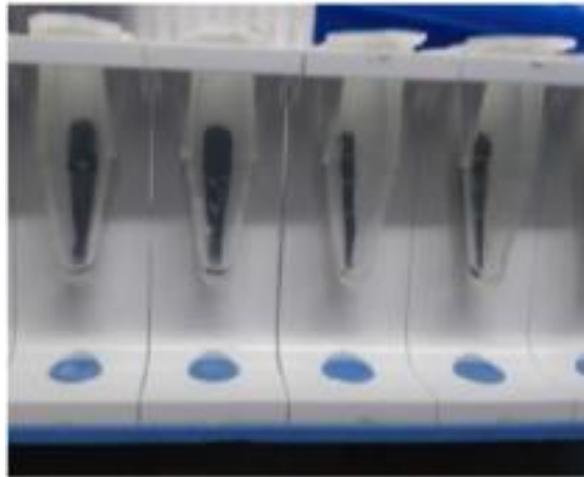


Figura 4. Sedimentación de perlas magnéticas con protocolo MagaZorb®

3.12. Extracción de ADN de muestras biológicas

El aislamiento de ADN se estandarizó en base al protocolo de MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para heces fecales, que utiliza perlas magnéticas, con varias modificaciones: se pesó 50 mg de la muestra de heces fecales en un tubo con capacidad de 1.5 mL, se realizaron tres lavados con 700 μ L de PBS 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) centrifugando por 5 minutos a 14000 r.p.m. a 4°C. se retiró con una pipeta el sobrenadante teniendo cuidado de no dañar el pellet generado al fondo del microtubo, se añadió 250 μ L de PBS 1X, se añadió 20 μ L de solución PK, bien mezclado, al centro del tubo, y evitando tocar los lados del microtubo mientras se pipetea, se mezcló suavemente girando el tubo teniendo cuidado de no permitir que cualquiera de las muestras de

solución / PK queden atrapados en la tapa del microtubo, se cerró el tubo y se mezcló por vórtex durante 15 segundos, se agregó 200µl de tampón de lisis bien mezclado al microtubo, se mezcló bien por vórtex hasta obtener una mezcla homogénea, (aproximadamente 15 segundos), se incubó en baño maría a 56°C durante 2 horas y media usando un flotador de espuma, se quitó el tubo del baño maría y se secó el exterior del tubo con un papel de toalla, se añadió 20uL de *MagaZorb Reagent* (perlas) el cual fue homogenizado por vórtex, se añadió 200 uL de binding buffer homogenizado por vortex, se incubó al ambiente por 10 min. mezclando manualmente cada 2 min, se colocaron los tubos en la gradilla magnética y se dejó reposar por 3 minutos, se retiró la fase líquida generada teniendo cuidado de no tomar las perlas pegadas al magneto en la pared lateral del microtubo, se retiró el tubo de la gradilla magnética, se añadió 500uL de *Wash Buffer* y se homogenizó por vortex hasta suspender todas las partículas, se colocó en la gradilla magnética dejando reposar durante tres minutos y se retiró la fase líquida sujetando el tubo firmemente contra la gradilla procurando retirar todo el líquido tanto del tubo como de la tapa, se realizó dos lavados adicionales con 500 µL de Wash Buffer para remover las proteínas y remanentes de contaminantes. Se añadió 100uL de *Elution Buffer* y se homogenizó las perlas manualmente, se incubó durante 10 minutos en baño maría a 56°C, se colocaron las muestras en la gradilla magnética durante tres minutos y se extrajo la fase líquida en cantidades pequeñas hasta trasvasar en un nuevo tubo estéril debidamente etiquetado. Al finalizar, el ADN se almacenó a -20°C.

3.13. Cuantificación de ADN

Se realizó la cuantificación de los ADN extraídos para verificar su cantidad y calidad mediante espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA). Se efectuaron mediciones de absorbancia y se obtuvieron las relaciones 260/280 y 260/230, para analizar la presencia de contaminantes proteínicos y orgánicos.

3.14. Normalización de ADN

Debido a la variación no deseada que puede ser introducida durante la preparación de la muestra, la normalización de datos es un aspecto importante. Las diferencias en las concentraciones incluidas en el análisis pueden producir conclusiones inexactas en la ausencia de una normalización apropiada. Por tales motivos, se realizó la normalización de la concentración de ADN de las muestras (Tabla 2), efectuando cálculos en base a la cuantificación obtenida de cada una mediante espectrofotometría.

Tabla 2. Fórmula para el cálculo de normalización

Formula	Donde
$C1.V1 = C2.V2$	C1 = concentración de ADN madre C2 = concentración a la que se desea normalizar V1 = volumen de ADN que se debe diluir V2 = volumen al que se afora la muestra

3.15. Estandarización del diagnóstico de *Giardia lamblia* por técnicas moleculares en muestras biológicas.

La optimización de la PCR es crucial para obtener resultados fiables. La estrategia es variar uno o más de los muchos parámetros que se sabe contribuyen a la fidelidad de la técnica (Roux, 2009). Un paso crítico es el alineamiento de los cebadores con sus secuencias diana, ya que tiene que ocurrir a una temperatura y concentración correctas, evitando la no especificidad y la formación de dímeros (Taylor, Wakem, Dijkman, Alsarraj, & Nguyen, 2010).

La amplificación de productos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR punto final ha demostrado ser un método con gran potencial en el diagnóstico de enfermedades de origen infeccioso.

3.16. Reacción en cadena de la polimerasa punto final para el gen 18S de *Giardia lamblia*

Se realizó una PCR punto final (PCRep) para la detección de ADN de *Giardia lamblia* mediante la amplificación de una porción del gen 18S que codifica para la subunidad ribosomal menor, por medio de los cebadores específicos, que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Especificaciones de los cebadores para el gen 18S de *Giardia lamblia*.

Primer Forward	5' GACGGCTCAGGACAACGGTT 3'
Primer Reverse	5' TTGCCAGCGGTGTCCG 3'

3.16.1 Optimización de la PCR y diagnóstico de *G. lamblia* en muestras biológicas.

La optimización de la PCR se realizó probando diferentes gradientes de temperatura y concentraciones de MgCl₂, cebadores y cantidad de ADN, para encontrar las óptimas para la reacción, además se realizó una prueba de PCR a partir de diluciones seriadas para determinar el límite de detección de la técnica.

El ADN utilizado como control positivo fue el obtenido mediante la técnica de purificación del parásito, además se incluyó un control negativo NTC (no template control) incluyendo todos los reactivos y colocando agua en lugar de ADN para verificar que no exista presencia de contaminantes que pueden invalidar los resultados.

Se utilizó el kit comercial GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, Madison, USA) para la optimización de la PCR y el diagnóstico de *G. lamblia*. La concentración final de los diferentes componentes de la reacción para la amplificación fue: 1X buffer ready to use, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPS, 1,25 U/L de Taq polimerasa, 0,4 M de cada cebador y 1 uL de ADN, para una reacción final de 25 uL.

La PCR fue realizada en el termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), una vez determinadas las mejores condiciones se procedió a la amplificación mediante termociclación con una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C durante 30 segundos, una temperatura de elongación de 72°C durante 45 segundos, estos ciclos se repitieron 30 veces, una elongación final a 72°C durante 7 minutos, y finalmente una temperatura de 4°C durante 10 minutos para detener la reacción.

3.16.2 Especificidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

La especificidad de la técnica, para comprobar que no se amplifica algún otro tipo de organismo o secuencia, se determinó realizando una PCR con los cebadores de *G. lamblia* y los ADN de controles positivos para *Fasciola hepatica*, *Entamoeba spp*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Ascaris spp*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia spp* y *Echinococcus granulosus* como dianas. Se utilizó el kit comercial GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, Madison, USA) para la evaluación de especificidad de la PCR. La concentración final de los diferentes componentes de la reacción optimizada fue: 1X buffer ready to juice, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPS, 1,25 U/uL de Taq polimerasa, 0,4 uM de cada cebador y 1 uL de ADN, para una reacción final de 25 uL. El termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) fue utilizado para la amplificación, mediante las siguientes condiciones: una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C durante 30 segundos, una temperatura de elongación de 72°C durante 45 segundos, estos ciclos se repitieron 30 veces, una elongación final a 72°C durante 7 minutos,

y finalmente una temperatura de 4°C durante 10 minutos para detener la reacción.

3.17 Electroforesis en gel de agarosa

Para observar los resultados de las diferentes amplificaciones mediante PCR, los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) con buffer tampón TBE (Tris-HCl, Ácido Bórico, EDTA 0,5 M pH=8) 1X y teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA ladder (Invitrogen, Waltham, MA, USA) y se realizó la corrida durante 45 minutos a 120 voltios. La visualización se efectuó en el Fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.18 Análisis de datos

Los resultados fueron analizados como se observa en la Tabla 4, para diagnóstico de muestras positivas o negativas por PCR y por diagnóstico óptico.

Tabla 4. Parámetros para resultados de PCR y microscopía.

Resultado	PCR	Microscopia
Positivo	Presencia de banda de amplificación	Presencia de quiste o trofozoíto
Negativo	Ausencia de banda de amplificación	Ausencia de quiste o trofozoíto

3.19 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se procedió al cálculo estadístico Kappa de Cohen empleando el software estadístico IBM SPSS Statistics 22 y tablas de contingencia.

El cálculo de la sensibilidad, especificidad, fiabilidad y de valores predictivos se realizó en el software estadístico WinEpi 2006 considerando como prueba gold estándar al diagnóstico microscópico.

Para determinar la correlación de variables socioeconómicas y antropométricas con la presencia de *Giardia lamblia* se procedió a

realizar el test de Ji cuadrado (X²) con un nivel de significancia de 0.05 en el software estadístico Epi Info 7.

3.20 Análisis de factores de riesgo

Se realizó una encuesta para determinar los posibles factores de riesgo que pueden influir en la infección parasitaria, en este trabajo se tomó en cuenta la correlación entre estos factores y la infección por *G. lamblia*, para lo cual se tomaron preguntas de la Encuesta de Estratificación del Nivel Socioeconómico realizada por el INEC (2011), en la tabla 5 se muestran los factores analizados.

Tabla 5. Factores analizados en el estudio

Variables	
Procedencia de Agua	<ul style="list-style-type: none"> • Agua de ríos y vertientes • Entubada no Potable • Potable • Pozo
Presencia de animales en el hogar	<ul style="list-style-type: none"> • Aves • Animales de corral • Cuyes • Gatos • Perros
Lavado de manos	<ul style="list-style-type: none"> • Antes de preparar comidas • Antes de ingerir alimentos • Después de ir al baño • No lavarse las manos
Tipo de vivienda	<ul style="list-style-type: none"> • Material del piso • Material de las paredes
Nivel de Instrucción de jefe del hogar	<ul style="list-style-type: none"> • Nivel de últimos estudios
Variables antropométricas	<ul style="list-style-type: none"> • Obesidad • Sobrepeso

	<ul style="list-style-type: none">• Normal• Emaciado
--	---

CÁPITULO IV

4. RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los resultados del presente trabajo fueron los siguientes:

El primer paso fue realizar el coproparasitario simple en las muestras obtenidas de los escolares incluidos, se analizó los resultados obtenidos según esta técnica.

4.1 Diagnóstico por microscopía óptica.

De las 414 muestras analizadas, los resultados por microscopía óptica (coproparasitario simple con Suero Fisiológico) muestran 29 muestras con la presencia de quistes o trofozoítos positivos y 385 negativos (figura 5), en el anexo 7 se detallan estos resultados.

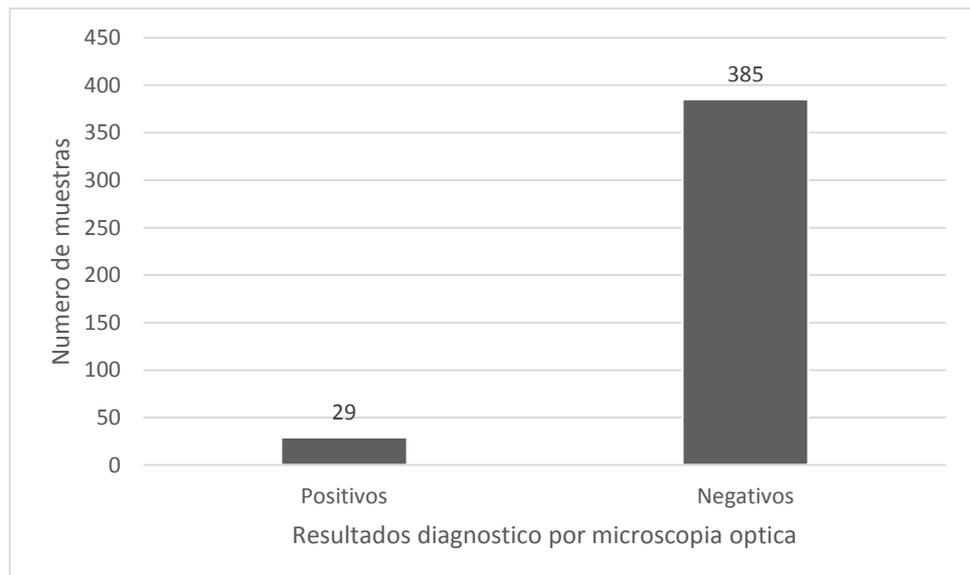


Figura 5. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de *G. lamblia* por microscopía óptica.

Se realizó el análisis de otras parasitosis cuya prevalencia total se muestra en la figura 6.

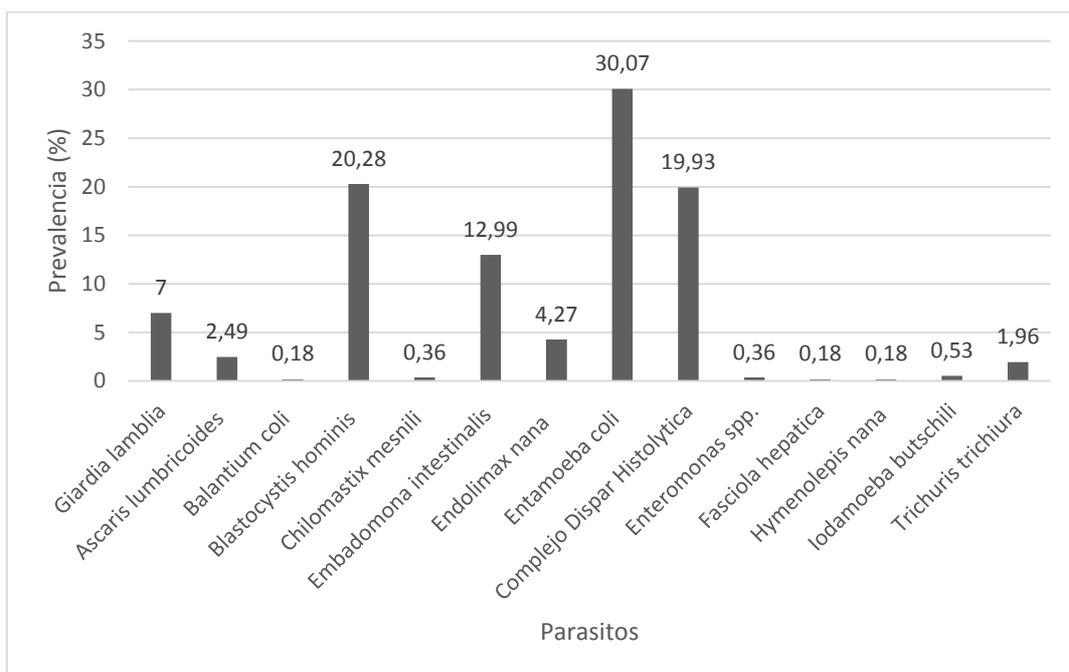


Figura 6. Prevalencia total de parasitosis analizadas por microscopia.

La segunda actividad desarrollada fue, obtener alícuotas del material fecal de cada escolar incluido, colocarla en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5% y analizar cuál de los dos es el que mejor conservo el ADN parasitario durante el transporte de campo hasta el laboratorio y durante la estadía de las muestras en este hasta su análisis. Los resultados encontrados se expresan en los siguientes apartados conforme se desarrolla el proceso de optimización de la PCR.

4.2. Extracción de ADN parasitario para control positivo.

Para la validación de la detección del parásito en las muestras analizadas, fue necesario contar con un control positivo para evidenciar la presencia o no del mismo en los análisis moleculares, para confirmar la presencia de los quistes purificados se realizó una nueva placa a ser observada al microscopio una vez aplicada la técnica. Se obtuvo una concentración de 159.8 ng/μL, la cual es óptima para los fines requeridos. Se obtuvieron los valores de absorbancia de 1,58 para la relación 260/280 y 1.11 para la 260/230, concluyendo que podría existir una ligera contaminación con proteínas y orgánicos, la cual no era significativa y funcionó para nuestros objetivos tomando en

cuenta que la muestra proviene de heces fecales humanas. La curva de absorbancia obtenida se puede observar en la figura 7.

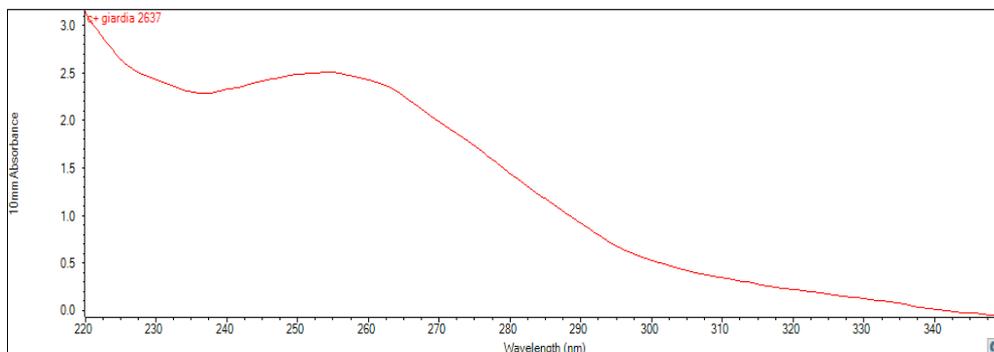


Figura 7. Resultado de curva de absorbancia obtenida de espectrofotómetro Nanodrop 2000 de ADN extraído del control positivo de *G. lamblia* aislado de muestra biológica.

4.3. Optimización del método de extracción de ADN de *Giardia lamblia* en muestras biológicas.

En el presente estudio se utilizó el kit comercial MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit, con modificaciones al protocolo del inserto.

Una vez realizada la extracción se compararon las medias de las concentraciones y ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 para los dos métodos. El promedio de las concentraciones de ADN para las muestras conservadas en etanol 70% fue de 117.29 ng/uL, mientras que para las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% fue de 114.53 ng/uL, mostrando una concentración ligeramente mayor en las muestras conservadas en etanol 70%.

Para las muestras conservadas en etanol 70% las medias de los ratios 260/280 y 260/230 fueron de 1.61 y 0.77, respectivamente. Mientras que para las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% fue de 1.76 para el ratio 260/280 y 0.94 para el ratio 260/230. En la figura 8 se puede observar la calidad de las extracciones de ADN con los dos conservantes en un gel de agarosa al 1.8%.

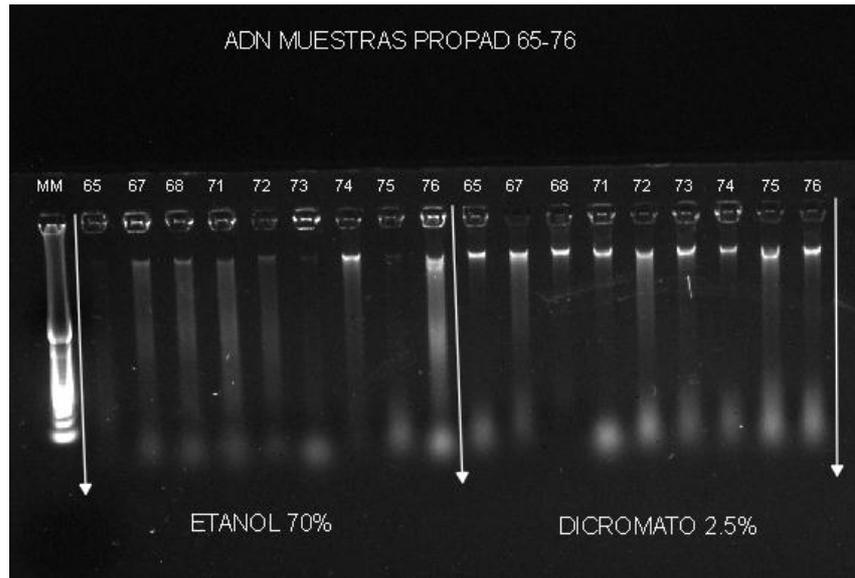


Figura 8. Foto de gel de agarosa al 1.8% de ADN de parásito extraído. MM: marcador de peso molecular (100pb). Muestras 65, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 76.

Los resultados obtenidos muestran que las extracciones de ADN realizadas en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% muestran una banda más clara al momento del revelado de la electroforesis.

4.4. Normalización de ADN total en muestras biológicas.

La normalización en las concentraciones de ADN es un punto importante, debido a la variación no deseada que puede ocurrir en los análisis posteriores, se estableció este proceso mediante el promedio de las concentraciones de las muestras de ADN en ng/uL, estas determinaciones se normalizaron hacia donde converge el mayor número de puntos, procurando la menor cantidad de puntos por debajo ya que solo podemos diluir las muestras a un valor referencial, determinando así la concentración a la que se diluyeron las muestras conservadas en etanol 70% en 45.3 ng/uL y 44.1 ng/uL a las muestras que se conservaron en dicromato 2.5%, en las figuras 9 y 10 se muestran los puntos de dispersión. El empleo de este método permitió diluir los remanentes de contaminantes que pudieron haber quedado durante el proceso de extracción de las muestras biológicas,

mejorando la pureza del ADN, para obtener una adecuada detección del parásito mediante las técnicas moleculares y evitar la acción de posibles inhibidores de la PCR.

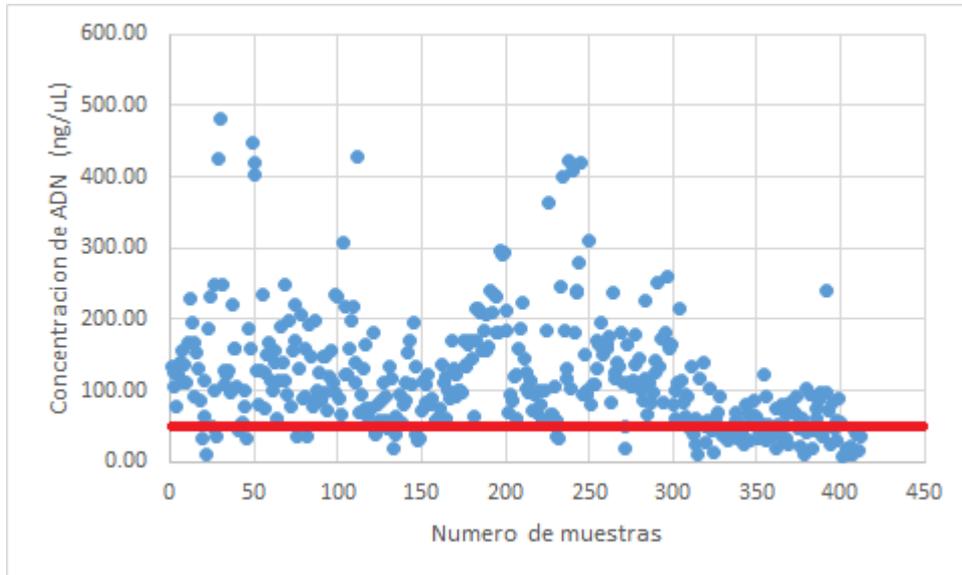


Figura 9. Convergencia de las concentraciones de ADN en las muestras conservadas en etanol 70%.

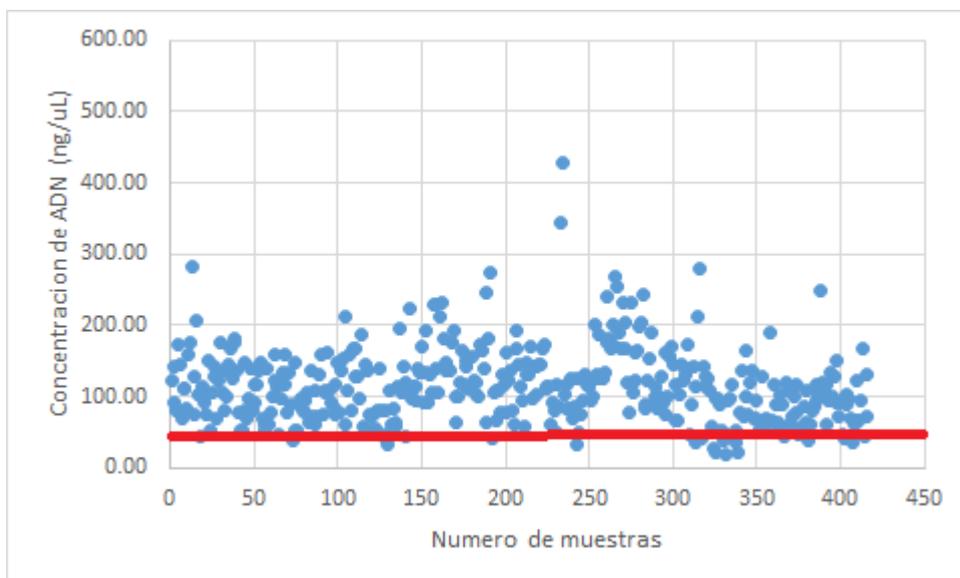


Figura 10. Convergencia de las concentraciones de ADN en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.

4.5. Extracción de ADN total en muestras biológicas.

Se obtuvieron un total de 828 muestras de ADN extraídas a partir de 414 muestras de heces fecales conservadas en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5%. Las cuantificaciones que fueron obtenidas por espectrofotometría se muestran en el anexo 5. Un ADN óptimo fue obtenido de las muestras, con un promedio de concentración de 117.29 ng/uL para las muestras conservadas en etanol 70%, mientras que para las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% fue de 114.53 ng/uL, mostrando una concentración ligeramente mayor en las muestras conservadas en etanol 70%.

Los radios de absorbancia indican la pureza y calidad del ADN. Los promedios obtenidos para las relaciones 260/280 y 260/230 fueron de 1.61 y 0.77 respectivamente para las muestras conservadas en etanol 70% y 1.76 y 0.94 respectivamente para las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%. Los resultados obtenidos para el radio 260/280 indican una relación de absorbancia aceptable, tomando en cuenta que son muestras obtenidas de heces fecales y puede existir una ligera contaminación con proteínas, con una mayor pureza en las muestras conservadas de dicromato de potasio 2.5%, mientras que la relación 260/230 es relativamente baja pudiendo deberse a remanentes de contaminantes orgánicos como alcoholes que no se removieron completamente durante el proceso de aislamiento del ácido nucleico, sin embargo las concentraciones y calidad del ADN obtenido es admisible para los fines propuestos mostrando una mayor pureza en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.

4.6. Determinación del diagnóstico de *Giardia lamblia* por técnicas moleculares en muestras biológicas.

Después de la extracción de ADN a partir de muestras biológicas, se procedió a determinar el diagnóstico óptimo para *G. lamblia* por técnicas moleculares, para lo cual nos valimos del método de PCR convencional en la investigación, se realizó la optimización del método variando los parámetros de la PCR, hasta establecer las concentraciones y medidas para una correcta detección. Luego se

efectuó la detección de las 414 muestras de ADN por PCR punto final tanto para las muestras conservadas en etanol 70% como en dicromato de potasio 2.5%.

4.6.1. Optimización de la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S rRNA de *Giardia lamblia*.

Se realizaron variaciones con distintos gradientes de temperatura y a diferentes concentraciones de MgCl₂, primers y cantidad de ADN, para encontrar los parámetros apropiados para la amplificación de *G lamblia*.

4.6.2. Gradiente de temperatura de la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S rRNA de *Giardia lamblia*.

Se probaron diferentes temperaturas de anillamiento para la PCR, tanto para las muestras conservadas en etanol 70% como en dicromato de potasio 2.5%, determinando una temperatura optima a los 60°C donde se observa una banda más clara y con menor cantidad de barrido, en la figura 11 se observa la electroforesis del producto de PCR con gradiente de temperatura.

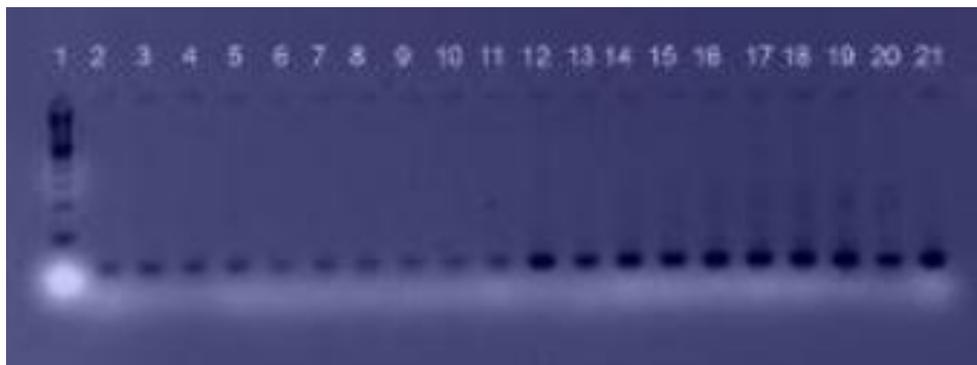


Figura 11. Gel electroforesis 4X. 1: DNA Ladder 100 pb. 2-11: *G. lamblia* etanol. 12-21: *G. lamblia* dicromato. 2,3; 12,13: 62°C. 4,5; 14,15: 60°C. 6,7; 16,17: 58°C. 8,9; 18,19: 56°C. 10,11; 20,21: 54°C.

4.6.3. Diferente concentración de cebadores para la reacción en cadena la polimerasa punto final para el gen 18S rRNA de *Giardia lamblia*.

Se probaron diferentes concentraciones de primers para la PCR, determinando una concentración óptima en 400nM donde se observa una banda más clara y con menor inespecificidad, en la figura 12 se observa la prueba realizada para concentración de cebadores.



Figura 12. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR. MM: marcador de peso molecular (50pb). 0.5uL: 133nM. 1u: 266nM, 1.5uL: 400nM. NTC: no template control.

Una vez realizadas las pruebas de optimización se determinó una temperatura óptima de anillamiento para la PCR de 60°C en 30 ciclos, con una concentración de cebadores de 400 nM, 2 mM de MgCl₂ y 1 uL de ADN, asegurando el anillamiento al templado sin inespecificidades, luego de la optimización, se determinó la presencia o ausencia de material genético de *G. lamblia* en las muestras de ADN extraídas de la muestra biológica de los pacientes por ausencia o presencia de la banda correspondiente.

Con esta técnica se obtuvieron en el caso de las muestras conservadas en etanol 70%: 43 muestras positivas con una banda de 62 pb correspondiente al gen 18S rRNA específico de *G. lamblia* y 371 negativas, donde no se observó presencia de la banda (figura 13)

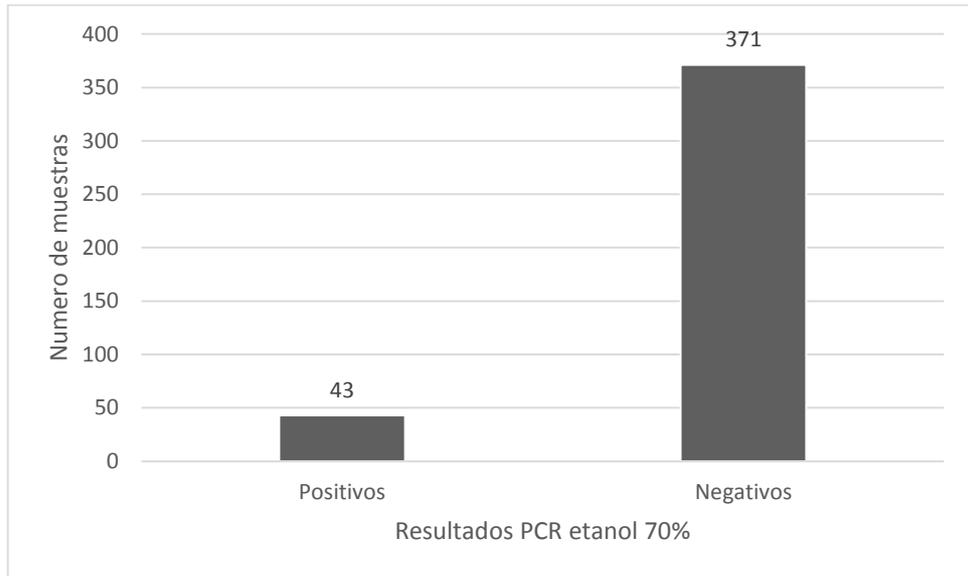


Figura 13. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de *G. lamblia* por PCR punto final en muestras conservadas de etanol 70%.

Mientras que para las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% se obtuvieron 49 positivos y 365 negativos (figura 14). En el Anexo 7 se detallan los resultados de cada una.

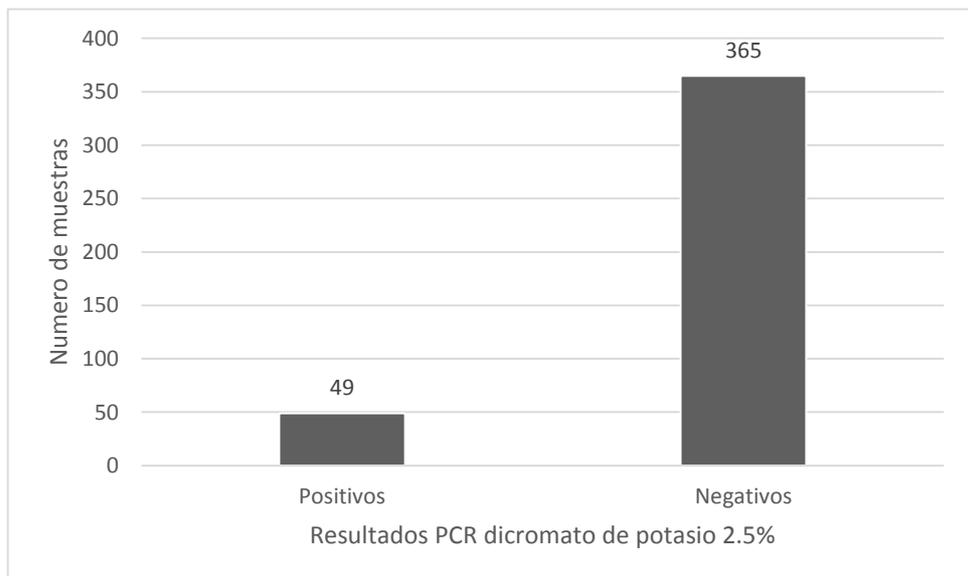


Figura 14. Gráfico de barras de resultados de diagnóstico de *G. lamblia* por PCR punto final en muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.

4.7. Especificidad de las pruebas moleculares.

Como controles de especificidad de la reacción con los cebadores de *G. lamblia* para PCR punto se utilizó ADN de parásitos puros y muestras biológicas positivas de *Fasciola hepatica*, *Entamoeba spp*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Ascaris spp*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia spp* y *Echinococcus granulosus*. Los resultados mostraron que no existió amplificación para ninguno de los parásitos, como se observa en la Figura 15 para la PCR punto final, demostrando que los cebadores para amplificación de gen 18S rRNA de *G. lamblia* son específicos para el parásito, y permitieron obtener resultados fiables en los ensayos realizados.

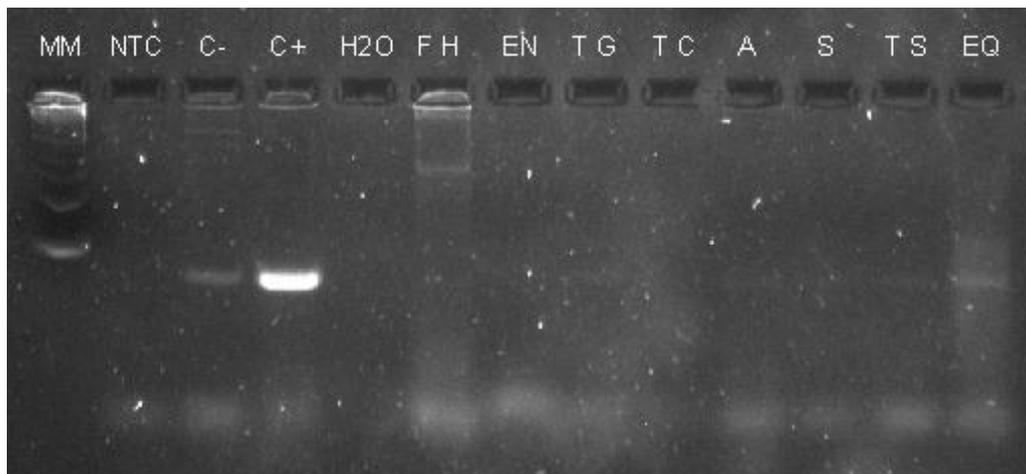


Figura 15. Ensayo de especificidad de cebadores de PCR. Gel de agarosa 2%. MM: marcador de peso molecular (100pb). NTC: no template control. C-: control negativo. C+: control positivo. H2O: agua. FH: *Fasciola hepática*. EN: *Entamoeba spp*. TG: *Toxoplasma gondii*, TC: *Toxocara canis*. A: *Ascaris spp*. S: *Strongyloides stercoralis*. TS: *Taenia solium*. EQ: *Echinococcus granulosus*.

4.8. Límite de detección de pruebas moleculares

Se realizaron diluciones seriadas 1/10 por cada dilución para probar el límite de detección del diagnóstico molecular para las muestras conservadas en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5%, a partir del ADN del control positivo el cual se encuentra a una concentración de

159.8 ng/uL después de la respectiva prueba de PCR se determinó el límite de detección en el caso de las muestras conservadas en etanol 70% en una concentración de 1 ng/uL de ADN. En el caso de las muestras conservadas en dicromato de potasio se determinó un límite de detección de 150 pg/uL de ADN, lo cual demuestra una alta sensibilidad en la técnica de diagnóstico molecular, mostrando una mayor sensibilidad en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%, llegando al nivel de picogramos de ADN en la detección. En la Figura 16 se muestra la prueba realizada para el límite de detección.

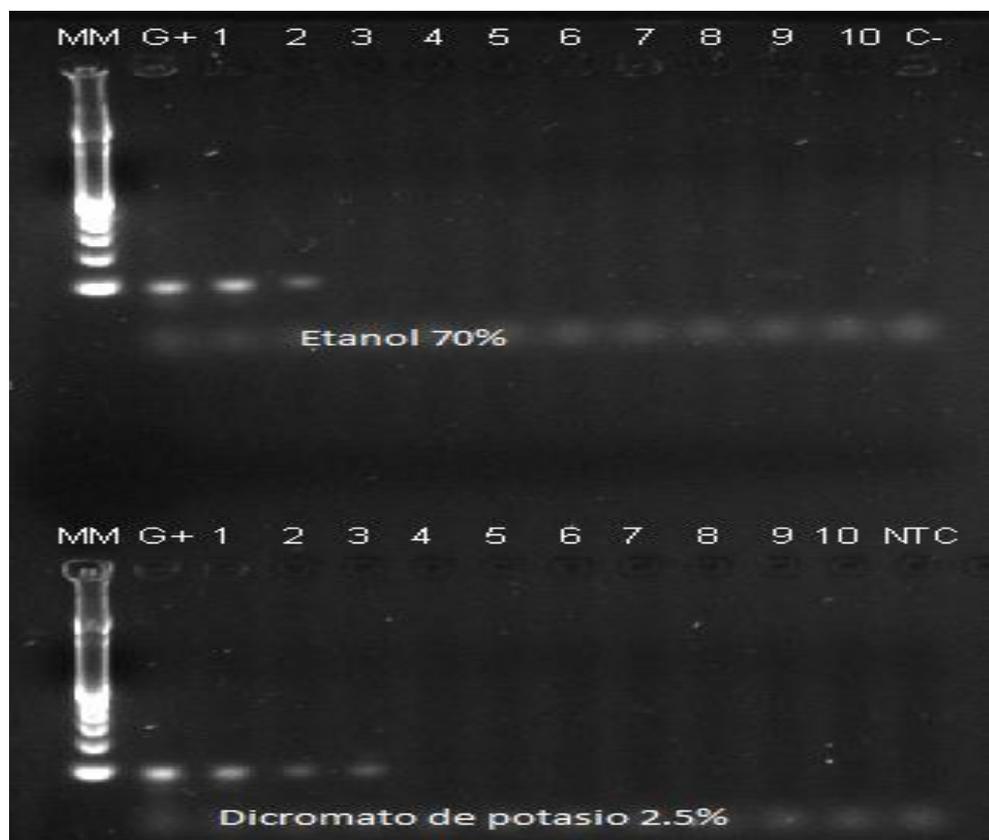


Figura 16. Límite de detección mediante diluciones seriadas 1/10 para las muestras conservadas en etanol 70% y dicromato de potasio 2.5%. Gel de agarosa 2%. MM: marcador de peso molecular. G+: control positivo *G. lamblia* (159.8 ng/uL). 1: dilución 1 (15.9 ng/uL). 2: dilución 2 (1.5 ng/uL). 3: dilución 3 (150 pg/uL). 4: dilución 4 (15 pg/uL). 5: dilución 5 (1.5 pg/uL). 6: dilución 6 (150 fg/uL). 7: dilución 7 (15 fg/uL). 8: dilución 8 (1.5 fg/uL). 9: dilución 9 (150 ag/uL). 10: dilución 10 (15 ag/uL). C-: control negativo. NTC: no template control.

Una vez estandarizada la prueba PCR punto final para diagnóstico molecular de *Giardia lamblia*, se realizó el paneo para el total de muestras a analizar, en la figura 17 se muestra una imagen del paneo realizado, donde se evidencia una banda más clara en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.

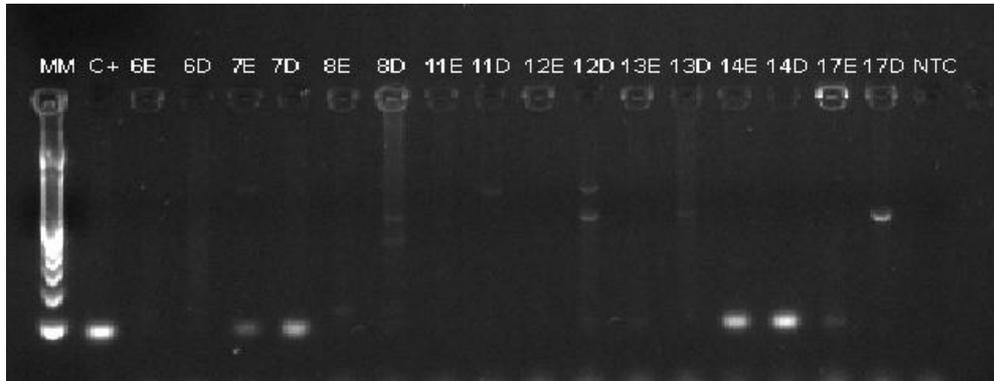


Figura 17. Foto de gel de agarosa al 2% de PCR para diagnóstico molecular de *Giardia lamblia*. MM: marcador de peso molecular (50pb). C+: control positivo. 6 – 17 muestras analizadas (E: etanol 70%, D: dicromato de potasio 2.5%) NTC: no template control.

4.9. Análisis de datos.

La Figura 18 muestra a la población de positivos y negativos, comparando los métodos de diagnóstico. De acuerdo a los resultados logrados, se observó un mayor porcentaje de muestras de individuos positivos para el gen 18S rRNA en las diagnosticadas con PCR punto final a partir de las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% con un 11,84% (49/414), en las muestras conservadas en etanol 70% el porcentaje de positivas es 10.39% (43/414), en contraste con el diagnóstico óptico con la que se obtuvo 7% (29/414). Mostrando una mayor sensibilidad en las pruebas realizadas mediante diagnóstico molecular.

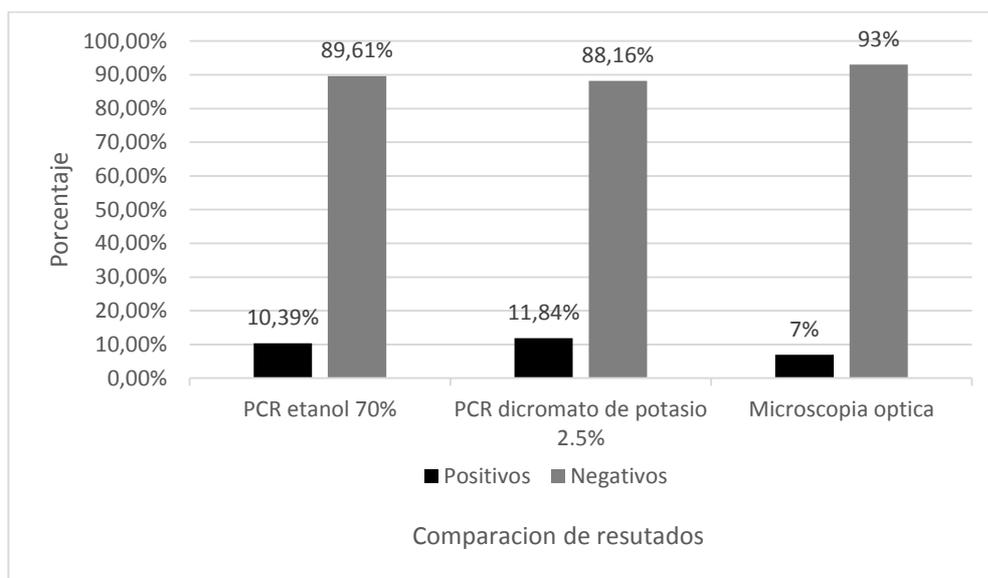


Figura 18. Gráfico de resultados (%) en relación a los distintos tipos de diagnóstico.

4.10. Prevalencia de *Giardia lamblia*.

Se determinó la prevalencia de *Giardia lamblia* a partir de la prueba que resulto ser más sensible la cual fue la PCR sumando los resultados positivos de las muestras conservadas en etanol 70% y las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5. Los resultados de las muestras analizadas nos arrojan una prevalencia total de 15.46% (64/414) frente a una prevalencia de 7% (29/414) en el diagnostico por microscopia óptica, mostrando una mayor sensibilidad en las técnicas moleculares. En la figura 19 se muestra los resultados de prevalencia comparando métodos moleculares y métodos ópticos. En lo que se refiere a la prevalencia por provincias se encontró 15% en Pichincha, 29,41% en Loja, 16.58% en Guayas y 10,64% en Los Ríos, encontrando una prevalencia significativamente mayor en Loja. En la figura 20 se compara la prevalencia por provincias.

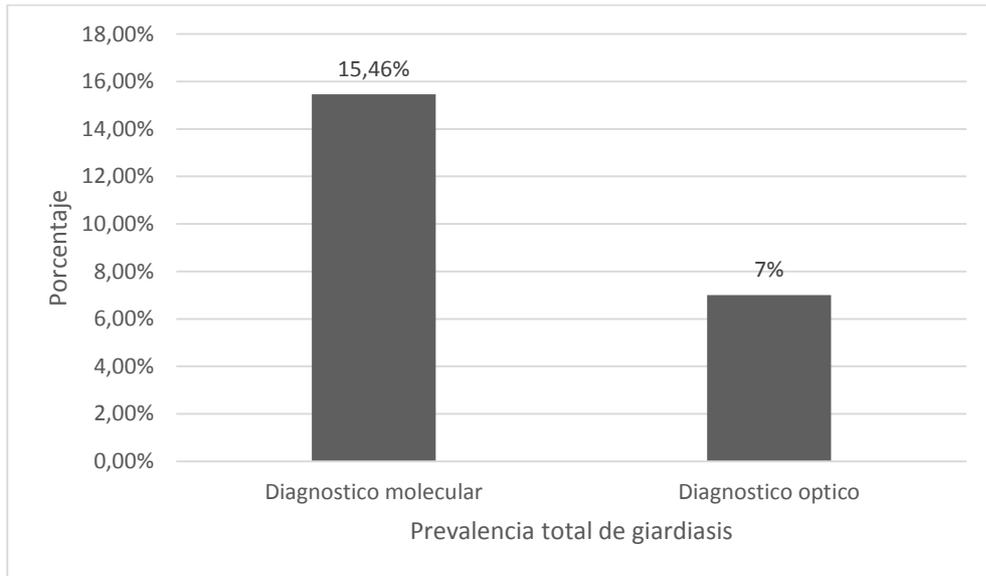


Figura 19. Gráfico de prevalencia total comparando los métodos de diagnóstico utilizados

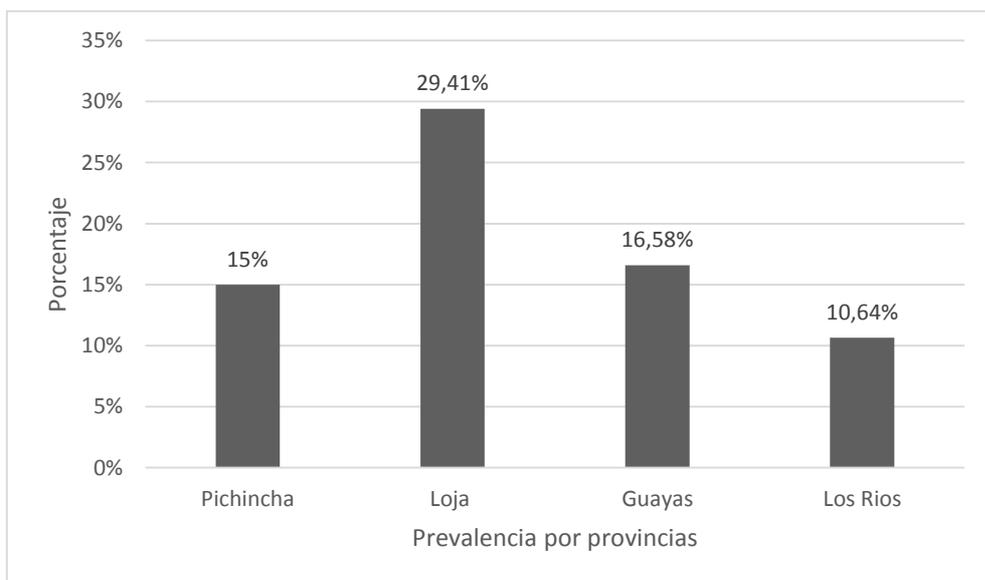


Figura 20. Gráfico de prevalencia de giardiasis por provincias mediante diagnóstico molecular.

4.11. Análisis estadístico.

4.11.1. Coeficiente Kappa de Cohen

A partir de los resultados del diagnóstico de *Giardia lamblia* por microscopía y por biología molecular con los dos conservantes se construyeron las tablas de contingencia microscopía*dicromato de potasio, microscopía*etanol y etanol*dicromato de potasio. Posteriormente se procedió al cálculo del estadístico Kappa de Cohen empleando el software estadístico IBM SPSS Statistics 22. Las tablas de contingencia y los resultados se presentan en las tablas 6 - 11.

Tabla 6. Tabla de contingencia microscopía*dicromato

			Diagnostico_microscopico		Total
			NO	SI	
Molecular_dicromato de potasio	NO	Recuento	356	9	365
		% del total	86,0%	2,2%	88,2%
	SI	Recuento	29	20	49
		% del total	7,0%	4,8%	11,8%
Total	Recuento		385	29	414
	% del total		93,0%	7,0%	100,0%

Tabla 7. Coeficiente Kappa para la tabla microscopía*dicromato de potasio

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,466	,073	9,876	,000
N de casos válidos		414			

Tabla 8. Tabla de contingencia microscopía*etanol

			Diagnostico_microscopico		Total
			NO	SI	
Molecular_etanol	NO	Recuento	355	16	371
		% del total	85,7%	3,9%	89,6%
	SI	Recuento	30	13	43
		% del total	7,2%	3,1%	10,4%
Total	Recuento		385	29	414
	% del total		93,0%	7,0%	100,0%

Tabla 9. Coeficiente Kappa para la tabla microscopía*etanol

		Valor	Error tí. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,303	,076	6,304	,000
N de casos válidos		414			

Tabla 10. Tabla de contingencia etanol*dicromato

			Molecular_etanol		Total
			NO	SI	
Molecular_dicromato de potasio	NO	Recuento	350	15	365
		% del total	84,5%	3,6%	88,2%
	SI	Recuento	21	28	49
		% del total	5,1%	6,8%	11,8%
Total	Recuento		371	43	414
	% del total		89,6%	10,4%	100,0%

Tabla 11. Coeficiente Kappa para la tabla etanol*dicromato de potasio

		Valor	Error tí. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,560	,065	11,425	,000
N de casos válidos		414			

4.11.2. Valoración de la fuerza de concordancia

(Cerde & Villarroel, 2008) indican los rangos de valoración para el coeficiente kappa, en base a los cuales se construyó la tabla 12 en donde se indica la fuerza de la concordancia entre los diagnósticos por microscopía y por biología molecular con dos conservantes diferentes.

Tabla 12. Coeficiente Kappa para la tabla etanol*dicromato de potasio

Métodos relacionados	Coeficiente Kappa de Cohen	Fuerza de la concordancia
Microscopía – Biología molecular (K ₂ Cr ₂ O ₇)	0.466	Moderada
Microscopía – Biología molecular (etanol)	0.303	Aceptable
B. molecular (K ₂ Cr ₂ O ₇) – B. molecular (etanol)	0.560	Moderada

4.11.3. Validez de la prueba: sensibilidad y especificidad

El cálculo de la sensibilidad, especificidad, fiabilidad y de valores predictivos se realizó en el software estadístico WinEpi considerando como prueba gold estándar al diagnóstico microscópico ya que es el más extendidamente utilizado.

4.11.3.1. Diagnóstico molecular (Dicromato de potasio)

Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Evaluación de la prueba diagnóstica por biología molecular con muestras conservadas en dicromato de potasio.

Parámetro	Valor calculado
Sensibilidad	68.97%
Especificidad	92.47%
Valor predictivo positivo	40.82%
Valor predictivo negativo	97.53%
Fiabilidad	90.82%

La sensibilidad y especificidad de la prueba es respectivamente 68.97% y 92.47%. Los valores predictivos permiten concluir que bajo las condiciones de este estudio, un individuo con diagnóstico positivo por biología molecular (con dicromato de potasio) tiene una probabilidad del 40.82% de estar realmente enfermo y un individuo con diagnóstico negativo tiene una probabilidad del 97.53% por de estar realmente sano.

4.11.3.2. Diagnóstico molecular (Etanol)

Los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Evaluación de la prueba diagnóstica por biología molecular con muestras conservadas en etanol.

Parámetro	Valor calculado
Sensibilidad	44.83%
Especificidad	92.21%
Valor predictivo positivo	30.23%
Valor predictivo negativo	95.69%
Fiabilidad	88.89%

La sensibilidad y especificidad de la prueba es respectivamente 44.83% y 92.21%. Los valores predictivos permiten concluir que bajo las condiciones de este estudio, un individuo con diagnóstico positivo por biología molecular (con etanol) tiene una probabilidad del 30.23% de estar realmente enfermo y un individuo con diagnóstico negativo tiene una probabilidad del 95.69% por de estar realmente sano.

4.11.4. Correlación con variables socioeconómicas.

Para determinar la correlación de variables socioeconómicas con la presencia de *Giardia lamblia* se procedió a realizar el test de Ji cuadrado (X^2) con un nivel de significancia de 0.05 en el software estadístico Epi Info 7, un software gratuito desarrollado por los CDC (Atlanta, Georgia, USA).

4.11.4.1. Procedencia del agua.

Las categorías de la variable “procedencia del agua” son: Agua de ríos y vertientes, entubada no potable, potable y pozo. Se determinó que no existe relación entre el lugar de procedencia del agua y la presencia del parásito (p-value = 0.5187).

4.11.4.2. Presencia de animales en el hogar.

Se correlacionó la presencia de animales en el hogar como aves (p-value = 0.5724), animales de corral (p-value = 0.2535), cuyes (p-value = 0.1409), gatos (p-value = 0.6462) y perros (p-value = 0.3580) con la presencia del parásito. En ninguno de los casos se encontró que exista una relación estadísticamente significativa.

4.11.4.3. Lavado de manos.

Se estudió la correlación entre el lavado de manos con la presencia del parásito. Se determinó que no existe relación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de *Giardia lamblia* con lavarse las manos antes de preparar las comidas (p-value = 0.2535), antes de

ingerir alimentos (p-value = 0.5628), después de ir al baño (p-value = 0.1156) o no lavarse las manos (p-value = 0.5812).

4.11.4.4. Tipo de vivienda.

Se analizó la relación estadística entre el material y tipo de vivienda con la el diagnóstico de *Giardia lamblia* en las muestras procesadas. Se encontró que la presencia del parásito no se encuentra estadísticamente correlacionado con el material de construcción del piso (p-value = 0.4485) ni con el material de construcción de las paredes (p-value = 0.2762) ni con el tipo de vivienda (p-value = 0.2140)

4.11.4.5. Nivel de instrucción del jefe del hogar

El test de Chi cuadrado permitió estudiar si existe correlación entre el nivel de instrucción del jefe del hogar y el diagnóstico de *Giardia lamblia*, obteniendo como resultado que la relación entre ambas variables no es estadísticamente significativa

4.11.5. Correlación con variables antropométricas - IMC

En primer lugar se clasificó el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo a lo sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en cuatro categorías: obesidad, sobrepeso, normal y emaciado. Para dicha clasificación se emplearon las tablas de patrones de crecimiento infantil de la OMS por edad y sexo con sus respectivos Z-score. En la categoría “emaciado” se ubicó aquellos valores de IMC menores a dos desviaciones estándar por debajo de la media de IMC correspondiente a la edad del individuo. La categoría sobrepeso corresponde a aquellos valores de IMC mayores a una desviación estándar por encima de la media correspondiente a la edad; y la obesidad se define como valores de IMC superiores a dos desviaciones estándar por encima de la media correspondiente a la edad. Los resultados se presentan en la figura 21.

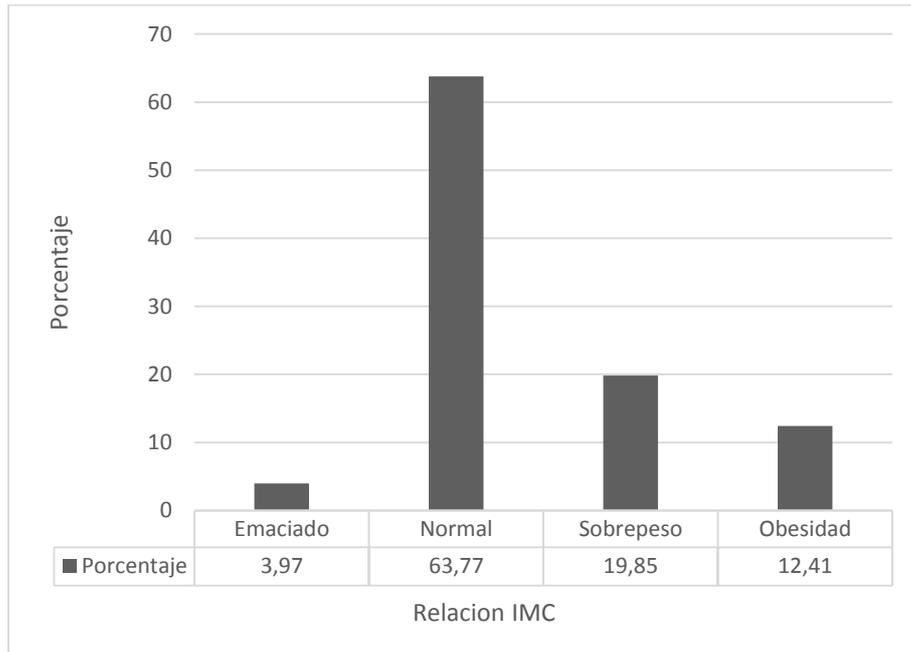


Figura 21. Condición nutricional de los individuos en la muestra.

Posteriormente se realizó la correlación entre el estado nutricional de los individuos de la muestra con el diagnóstico de *Giardia lamblia*, en donde se encontró que la relación entre ambas variables no es estadísticamente significativa (p-value = 0.6982).

CÁPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La giardiasis causada por el protozoo parásito *Giardia lamblia* (*Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) tiene una distribución global, con mayor incidencia en regiones tropicales y subtropicales (Mandel, Bennett, & Dolin, 2002). Se ha demostrado que este parásito es el más frecuente en los niños en edad preescolar, persistiendo durante mayor tiempo y mayor intensidad que otros parásitos intestinales y causando efectos adversos en el crecimiento y desarrollo, así como en el aprendizaje (Berkman et al., 2002; Chan, 1997; Savioli, Bundy, & Tomkins, 1992). La infección por *G. lamblia* se transmite a través de la ingesta de alimentos y agua contaminados y de persona a persona, de manera que en instituciones cerradas como centros educativos puede haber un mayor riesgo de transmisión. En la actualidad, este protozoo es considerado como el principal agente patógeno encontrado en brotes de agua causando epidemias en algunos países desarrollados como Inglaterra y los Estados Unidos. En este último país, se estima que causa no menos de 5.000 admisiones hospitalarias al año (Hill, 1993; Marshall, Naumovitz, Ortega, & Sterling, 1997; Ortega & Adam, 1997; WHO, 2013). Aunque la enfermedad puede ser leve o asintomática, por lo general se transmite por vía oral, y por lo tanto representa un contagio evitable. Sin embargo, para desarrollar programas de prevención adecuados, se necesita un conocimiento detallado de la prevalencia y los factores de riesgo, sin embargo en nuestro país hay muy poca información sobre esta enfermedad.

En el presente trabajo se realizó una evaluación de la infección por *G. lamblia*, mediante diagnóstico óptico, comparando técnicas moleculares, diferentes conservantes de muestras biológicas, determinación de los métodos de extracción y amplificación óptima del ADN para el diagnóstico del parásito así como posibles factores de riesgo que puedan influir en su adquisición.

Las muestras preestablecidas para el estudio fueron heces fecales conservadas en etanol al 70% y dicromato de potasio al 2,5%, que se obtuvieron directamente en campo visitando las escuelas objeto del estudio, aquí los talleres de prevención de la parasitosis fueron dados a los padres de familia y la encuesta se completó con la firma del respectivo consentimiento informado, se tomaron las muestras biológicas y se hicieron alícuotas en etanol 70% y dicromato de potasio 2,5%, en la escuela base el diagnóstico se realizó por microscopía óptica con las muestras en fresco teñidas con lugol. El diagnóstico comúnmente utilizado es por microscopía óptica, sin embargo, este puede presentar resultados con falsos negativos, debido a la expulsión intermitente de los quistes del parásito y también puede depender de la experticia del técnico encargado del diagnóstico, por lo que se requiere de métodos diagnósticos con mayor sensibilidad.

Después de los procedimientos llevados a cabo en las escuelas, la extracción de ADN tuvo que llevarse a cabo para el diagnóstico molecular del parásito. De acuerdo con (Tang & Stratton, 2013), cuando se utilizan muestras clínicas para extraer el ADN, debe reconocerse que el aislamiento está influenciado por las propiedades físicas del patógeno. Se sabe que la pared del quiste de *Giardia* es transparente y muy resistente tanto a factores físicos como químicos, lo que le da resistencia para sobrevivir a factores ambientales hostiles, por lo que en el presente estudio se realizó un ensayo definiendo la metodología ideal para la extracción de ADN a partir de heces, Teniendo en cuenta que el kit utilizado, contiene SDS como el componente principal del tampón de lisis.

Generalmente las técnicas utilizadas para la extracción de ADN para el diagnóstico de *G. lamblia* son kits comerciales. En nuestra investigación el método utilizado fue el kit comercial MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit, que utiliza perlas magnéticas, variando el protocolo del propio inserto del kit. Las concentraciones y la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos se comprobaron para mejorar el proceso. La estimación exacta de la concentración total de ADN es un componente crítico para la optimización del ensayo y para muchos procesos

analíticos que implican ácidos nucleicos, tales como análisis moleculares por PCR (Olson & Morrow, 2012). Al comparar las concentraciones promedio de ADN extraído con los dos diferentes conservantes, se observó que las muestras conservadas en etanol al 70% mostraban una concentración de ADN de 117,29 ng/ul, ligeramente superior a las muestras conservadas en dicromato de potasio al 2,5% con una concentración de 115,26 ng/ul, sin embargo esta diferencia no es significativa, teniendo en cuenta que en ambos casos se tomó la misma cantidad de muestra biológica. Es necesario tener en cuenta las características de la extracción con perlas magnéticas, donde un problema identificado por (Schuurman et al., 2005) en su estudio fue en la elución de ADN, donde hasta el 60% no pudo ser recuperado. En una investigación similar realizada por (Psifidi et al., 2015) se visualizó además que con este método, durante la etapa de lisis se forma entre otras cosas una espuma que contiene ADN y tiene que ser eliminada, ya que no se adhiere a las partículas magnéticas, perdiendo inevitablemente una cantidad de ácido nucleico. Sin embargo, nuestro estudio muestra concentraciones aceptables de ADN teniendo en cuenta que en las muestras fecales está contenido todo el contenido biológico que contiene entre otras cosas: las propias células epiteliales del cuerpo, restos alimenticios, otros parásitos y un sinnúmero de microorganismos.

Posteriormente, para determinar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos, se midieron los ratios de absorbancia en las relaciones 260/230 y 260/280 en un espectrofotómetro, ya que la integridad y pureza de los ácidos nucleicos se pueden evaluar usando mediciones de absorbancia y electroforesis en gel (Bhat et al., 2010). La relación 260/280 indica la pureza, siendo 1,8 ADN puro; Pero si la relación es menor puede indicar la presencia de proteínas u otros componentes fuertemente absorbentes o cercanos a 280 nm. El ratio 260/230 tiene valores esperados entre 2 y 2,2; Siendo una relación menor, sugiere la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, como EDTA, fenol o carbohidratos. Los resultados obtenidos para el promedio de los ratios 260/280 y 260/230 para muestras conservadas en etanol al 70%

fueron de 1,61 y 0,77 respectivamente. Se observó una diferencia con las muestras conservadas en dicromato de potasio 2,5%, donde los promedios fueron 1,76 para el radio 260/280 y 0,94 para el radio 260/230, lo que indica un ADN más limpio en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2,5%. Se ha encontrado que algunos químicos tienen una unión similar y pueden aislarse junto con el ácido nucleico, pudiendo incluso en algunos casos unirse abundantes contaminantes y saturar las perlas de extracción, evitando la unión del ADN y reduciendo su rendimiento (Broemeling et al., 2008). Debe tenerse en cuenta que las muestras biológicas para el análisis de la parasitosis son fecales por lo que requiere una mayor cantidad de lavados que pueden influir en su pureza y en su concentración, sin embargo, dentro del proyecto, el mismo kit es regularmente utilizado con éxito para el análisis de otros parásitos como *Fasciola hepatica*, *Entamoeba spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Ascaris spp*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, entre otros. En los resultados también se puede observar la calidad del ADN extraído (Anexos 5 y 6), observando una banda más clara con menor barrido en las muestras conservadas en dicromato de potasio 2,5%. De acuerdo con todo lo anterior y los resultados obtenidos, se concluyó que el conservante óptimo para la extracción de ADN a partir de heces era el dicromato de potasio 2.5%.

Posteriormente el método molecular para diagnosticar *G. lamblia* se optimizó en los pacientes incluidos en el estudio. Para la optimización de los métodos moleculares se evidenció la necesidad de un control positivo, que se requiere para la verificación de los resultados. Las variaciones de este control como describen (Espy et al., 2006) puede ser una muestra negativa inoculada con los organismos de interés o el ácido nucleico puro a detectar. De acuerdo con el análisis continuo del proyecto de campo y la incidencia relativamente alta de giardiasis en las muestras analizadas, se seleccionó una muestra biológica con diagnóstico positivo por microscopía óptica para *Giardia lamblia* con un valor de tres cruces para obtener una cantidad óptima de quistes del parásito y con diagnóstico negativo para otros parásitos

evitando así la contaminación cruzada. A partir de esta muestra, se aislaron los quistes de *G. lamblia* por medio de la técnica de flotación con sulfato de zinc, que separa los diferentes componentes de las heces por su grado de sedimentación, lo que nos permite obtener un control positivo tan puro como sea posible. Esto nos permitió realizar las pruebas y el posterior diagnóstico molecular del parásito en las muestras, similar al realizado por (Stensvold, Lebbad, & Verweij, 2011) con muestras fecales positivas de *Strongyloides stercoralis* como control positivo para sus ensayos de PCR.

A continuación se procedió con la optimización de los métodos moleculares, mostrando primero por qué estas técnicas son importantes. Según (Wong et al., 2014), la detección microscópica, la identificación morfológica de parásitos y los inmunoensayos para antígenos, son generalmente el estándar de referencia para el diagnóstico de laboratorio de este tipo de infecciones. Las limitaciones de tales ensayos incluyen la experiencia del operador y no han mejorado significativamente la sensibilidad de detección. Se ha demostrado que los avances en el diagnóstico molecular mediante amplificación de ácidos nucleicos pueden mejorar la detección de infecciones con baja carga parasitaria, la que puede pasar desapercibido por las técnicas actualmente utilizadas (Vasoo & Pritt, 2013). Los métodos moleculares más ampliamente utilizados son los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. La PCR es sin duda la técnica más ampliamente adoptada, incluyendo sus muchas variaciones, como PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR multiplex. Se ha explicado el caso particular de los protozoarios, en el que el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular, especialmente los que utilizan PCR, ha contribuido en gran medida a la identificación y control de estos patógenos, aumentando la velocidad de diagnóstico, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad e interpretación (Stensvold et al., 2011). La optimización de la PCR convencional se complica por la naturaleza impredecible de las reacciones, donde incluso pequeñas variaciones en cualquiera de los factores pueden tener un efecto sobre el amplicón resultante (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013).

Las dos técnicas diagnósticas: microscopía óptica y molecular fueron probadas en este estudio para establecer la mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *G. lamblia* en muestras de heces, encontrando una mayor sensibilidad en las pruebas moleculares realizada. Se realizaron pruebas de especificidad para la verificación de la idoneidad de los cebadores utilizados para evitar falsos positivos, en el caso del diagnóstico óptico la especificidad depende de la experiencia del técnico.

Se utilizó el coeficiente de Cohen Kappa para el análisis estadístico. Existen otras variables que muestran la utilidad de una prueba, como los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN). VPP es el porcentaje de pacientes con un resultado positivo que realmente tienen la enfermedad, y VPN es el porcentaje de individuos con un resultado negativo que no tienen realmente la condición (Parikh, Mathai, Parikh, Chandra, & Thomas, 2008). Estos parámetros dependen de la población que se analiza, por lo que coeficientes de verosimilitud positiva y negativa se calcularon en nuestro estudio (Fritz & Wainner, 2001) como la mejor medida para determinar la utilidad de una prueba diagnóstica, ya que calculan cuánto más probable es encontrar un resultado positivo en alguien con la enfermedad que en alguien sin ella. Como prueba gold estándar se tomó al diagnóstico óptico, ya que es el método utilizado globalmente para el diagnóstico de *Giardia lamblia*, aunque se ha demostrado que las técnicas moleculares son más sensibles. De acuerdo con los resultados mostrados y analizados, se concluyó que las muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5% presentan un mejor resultado en todos los parámetros analizados: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y confiabilidad. Por todo lo anterior, podemos concluir que para la extracción de ADN y el diagnóstico molecular del parásito, el mejor conservante de las muestras biológicas es el dicromato de potasio 2.5%, sin embargo es importante tener en cuenta que los dicromatos son cancerígenos ya que en el metabolismo son confundidos por los canales iónicos con el sulfato y pueden así alcanzar el núcleo celular, se reducen por la materia orgánica presente

y el cromo formado ataca la molécula de ADN, lo que no ocurre con el etanol.

En cuanto a la prevalencia y debido a la mayor sensibilidad de la prueba diagnóstica por métodos moleculares, se encontró un porcentaje mayor por este método, que alcanza el 15,46%, que está dentro del rango promedio de infección por *Giardia lamblia* a nivel mundial (10% -20%). En la segregación por provincias encontramos una prevalencia significativamente mayor en la provincia de Loja (29,41%). Esto puede deberse a que la población de donde se tomaron las muestras en esta provincia pertenece a las zonas rurales, donde el acceso a los servicios básicos es limitado, lo que influye significativamente en sus hábitos de salud e higiene.

Al realizar el análisis estadístico con los posibles factores de riesgo que pudieran estar influyendo en la infección, se evidenció que no estaban asociados con la presencia del parásito, sin embargo se recomienda que para realizar inferencia estadística sobre la correlación de variables basado en el test de Chi cuadrado, se lleve a cabo en el futuro un nuevo análisis con un mayor tamaño de muestra, debido a que en este trabajo, no en todos los casos se contó con las cinco observaciones mínimas por celda (en la tabla de contingencia) requeridas para que la prueba estadística sea completamente confiable, de igual manera este es un resultado parcial del proyecto total donde se analizara una n muestral significativamente representativa del país, donde se podrán obtener resultados más fiables.

Se ha visto que las pruebas comerciales son con frecuencia menos disponibles para la detección de microorganismos infecciosos, motivo por el cual los ensayos desarrollados en los laboratorios, como el propuesto en este estudio, aportan de esta manera métodos realizados en el país, y que contribuirán a la Salud Pública, para proponer las bases para políticas de prevención y promoción de información sobre *G. lamblia*. Reconociendo el carácter único de un estudio a este nivel en nuestro país, es importante una vez se tenga los resultados finales del proyecto, donde se conocerá la verdadera prevalencia y distribución

del parásito a nivel nacional, se tomen políticas públicas de salud tanto para tratar como para prevenir la infección causada por *Giardia lamblia*, ya que se invierte en campañas de desparasitación, sin embargo no existe un seguimiento para conocer la eficacia de la medicación utilizada, tampoco se conoce los verdaderos focos de infección, que son causa de recontagio. Si bien, el equipamiento, los reactivos involucrados y el entrenamiento de personal capacitado, es más costoso para realizar el diagnóstico molecular, este debe ser contrastado con la inversión que realiza el estado en campañas de prevención y desparasitación, y el costo en salud pública para tratar los síntomas causados por la infección, tanto en casos leves como en casos más graves.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda probar otras metodologías de extracción para obtener ADN de *G. lamblia* a partir de muestras biológicas donde se pueda obtener un ADN libre de impurezas.
- Se debe realizar la cuantificación exacta y precisa de ADN, ya que es importante la normalización para el análisis molecular de *G. lamblia* por métodos moleculares.
- Se debe dar importancia en las medidas preventivas contra el contagio del parásito ya que se encuentra una alta prevalencia del parásito, especialmente en zonas rurales.

- Se recomienda presentar resultados con una población mayor para encontrar resultados más fiables respecto a la asociación de la parasitosis con factores de riesgo y síntomas clínicos que se encuentran en la literatura.
- Se recomienda ejecutar estudios sociodemográficos que relacionen la infección de *G. lamblia*, para establecer la prevalencia y factores de contagio para desarrollar programas de prevención y desparasitación acorde a la realidad de nuestro país.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–75. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Agrello, R. S., & Eirale, C. (1996). Examen coproparasitario: metodología y empleo. Revisión técnico metodológica. *Rev. Méd. Urug.* Retrieved from goo.gl/6dCN4Qcontent_copy
- Amar, C. F. L., Dear, P. H., & McLauchlin, J. (2003). Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52(8), 681–683. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.05193-0>
- Asher, A. J., Waldron, L. S., & Power, M. L. (2012). Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. *Parasitology Research*, 110(2), 853–858. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2565-3>
- Atias, A. (2001). Parasitología médica. Retrieved from goo.gl/9DxpoS
- Baque, R. H., Gilliam, A. O., Robles, L. D., Jakubowski, W., & Slifko, T. R. (2011). A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Research*, 45(10), 3175–3184. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.032>
- Barash, N. R., Nosala, C., Pham, J. K., McNally, S. G., Gourguechon, S., McCarthy-Sinclair, B., & Dawson, S. C. (2017). *Giardia* Colonizes and Encysts in High-Density Foci in the Murine Small Intestine. *mSphere*, 2(3). Retrieved from <http://msphere.asm.org/content/2/3/e00343-16>
- Basuni, M., Mohamed, Ahmad, M., Zakaria, N. Z., & Noordin, R. (2012). Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. *Tropical Biomedicine*, 29(3), 434–442. Retrieved from http://www.medic.usm.my/images/files/pub-sept/indexed_30.pdf
- Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., Lopez, S. L., & Black, M. M. (2002). Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *The Lancet*, 359(9306), 564–571. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07744-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07744-9)

- Bhat, S., Curach, N., Mostyn, T., Bains, G. S., Griffiths, K. R., & Emslie, K. R. (2010). Comparison of Methods for Accurate Quantification of DNA Mass Concentration with Traceability to the International System of Units. *Analytical Chemistry*, *82*(17), 7185–7192. <http://doi.org/10.1021/ac100845m>
- Botero, D., & Restrepo, M. (1998). Conceptos generales sobre parasitología. *Parasitosis Humana*.
- Broemeling, D., Pel, J., Gunn, D., Mai, L., Thompson, J., Poon, H., & Marziali, A. (2008). An Instrument for Automated Purification of Nucleic Acids from Contaminated Forensic Samples. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, *13*(1), 40–48. <http://doi.org/10.1016/j.jala.2007.10.008>
- Buret, A. (2005). Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(suppl 1), 185–190. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900032>
- Buret, A. G., & Cotton, J. (2011). Pathophysiological Processes and Clinical Manifestations of Giardiasis. In *Giardia* (pp. 301–318). Vienna: Springer Vienna. http://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_19
- Buret, A., Mitchell, K., Muench, D., & Scott, K. (2002). Giardia lamblia disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*, *125*(1), 11–19. <http://doi.org/10.1017/S0031182002001853>
- Buret, A., Scott, K., & Chin, A. (2002). Giardiasis pathophysiology and pathogenesis. *Giardia: “The Cosmopolitan Parasite”, 1st Ed. BE Olson*. Retrieved from goo.gl/o8TQU7content_copy
- Butler, J. C., Crengle, S., Cheek, J. E., Leach, A. J., Lennon, D., O'Brien, K. L., & Santosham, M. (2001). Emerging infectious diseases among indigenous peoples. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(3 Suppl), 554–5. <http://doi.org/10.3201/eid0707.010732>
- Cacciò, S. M., Beck, R., Almeida, A., Bajer, A., & Pozio, E. (2010). Identification of Giardia species and Giardia duodenalis assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology*, *137*(6), 919–925. <http://doi.org/10.1017/S003118200999179X>

- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00068-1](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00068-1)
- Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), 75–80. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>
- Cacciò, S. M., Thompson, R. C. A., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21(9), 430–437. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>
- Caicedo, I., Márquez, P. N., Sánchez, M. L., Arauz, Á. O., Solorzano, L. F., Castro, G. J., & Pozo, W. O. (2017). Comparación de la sensibilidad de la PCR frente a otras técnicas de Laboratorio utilizadas para el diagnóstico de Leishmaniosis Cutánea en Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 5(1), 80–90. Retrieved from <https://goo.gl/9PkkVz>
- Cañavate, P., Cuadros, J., Martínez, R., & Martín, P. (2009). Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Procedimientos En Microbiología Clínica*. Retrieved from <https://goo.gl/BtwVZU>
- Cases, M., & Ríos, A. (1995). *La calidad en los laboratorios analíticos*. Reverte. Retrieved from <https://goo.gl/tHtRMp>
- Cercado, A. G. (2013). Factores predisponentes y diagnóstico de enfermedades parasitarias intestinales incidencia en el desarrollo pondo-estatural en niños/as, sector urbano marginal “Las Palmas” Milagro–Ecuador. *Repositorio de La Universidad Estatal de Milagro*, 10, 9–18. Retrieved from <http://repositorio.unemi.edu.ec/handle/123456789/3038>
- Cerda, J., & Villarroel, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58. <http://doi.org/10.4067/S0370-41062008000100008>
- Chakarova, B. (2004). Clinic, treatment and dispensary control of patients with lambliosis. *J Bulg Medic*. Retrieved from <https://goo.gl/HDTt1B>

- Chakarova, B., Miteva, I., & Stanilova, S. (2009). Giardiasis in humans—clinical and diagnostic study. *Proceedings of the Eighth National Conference*. Retrieved from <https://goo.gl/ByzuHs>
- Chan, M.-S. (1997). The global burden of intestinal nematode infections — Fifty years on. *Parasitology Today*, 13(11), 438–443. [http://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01144-7](http://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01144-7)
- Cho, S., Kim, J., & Park, S. (1990). Status of intestinal parasite infections in inhabitants of Palmar, Guayas province, Ecuador. *Korean J Parasitol*. Retrieved from <https://goo.gl/7auef8>
- Cortázar, A., & Rincón, E. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología PCR. *México, Instituto de Biotecnología, México. Extraído El*. Retrieved from <https://goo.gl/LyPHJW>
- Crespo, D. (2006). Desarrollo de métodos moleculares y su aplicación al estudio de la resistencia genética y patogenia molecular del Scrapie. Retrieved from <https://goo.gl/1veBfd>
- Cueto, A., & Feldman, R. (2006). Giardiosis. *Microbiología Biomédica. 2ª Edición. Buenos Aires*. Retrieved from <https://goo.gl/pHwQ7N>
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., ... Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165–256. <http://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
- Farthing, M. (1994). Giardiasis as a disease. *Giardia: From Molecules to Disease, CABI International*. Retrieved from <https://goo.gl/vdcnS2>
- Farthing, M. J., Mata, L., Urrutia, J. J., & Kronmal, R. A. (1986). Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 43(3), 395–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3953479>
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–40. <http://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>

- Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J., & Ellis, J. (2012). Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420–49. <http://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>
- Fonseca, D., Arbelaez, H., & Contreras, N. (2010). Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica. *Lecciones*. Retrieved from <https://goo.gl/iJZhnK>
- Fritz, J. M., & Wainner, R. S. (2001). Examining Diagnostic Tests: An Evidence-Based Perspective. *Physical Therapy*, 81(9), 1546–1564. <http://doi.org/10.1093/ptj/81.9.1546>
- Galindo, L. F., & Almannoni, S. A. (2010). Giardiasis ??Una zoonosis? *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 48(2), 108–113.
- García-Cervantes, P. C., Báez-Flores, M. E., Delgado-Vargas, F., Ponce-Macotela, M., Nawa, Y., De-la-Cruz-Otero, M. D.-C., ... Díaz-Camacho, S. P. (2017). Giardia duodenalis genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 180–187. <http://doi.org/10.3855/jidc.8223>
- Geurden, T., Vercruyse, J., & Claerebout, E. (2010). Is Giardia a significant pathogen in production animals? *Experimental Parasitology*, 124(1), 98–106. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.001>
- Gonçalves, E. M. N., Araújo, R. S., Orban, M., Matté, G. R., Matté, M. H., & Corbett, C. E. P. (2008). Protocol for DNA extraction of Cryptosporidium spp. oocysts in fecal samples. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(3), 165–167. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652008005000002>
- Gonen, C., Yilmaz, N., Yalcin, M., Simsek, I., & Gonen, O. (2007). Diagnostic yield of routine duodenal biopsies in iron deficiency anaemia: a study from Western Anatolia. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(1), 37–41. <http://doi.org/10.1097/01.meg.0000250583.07867.b7>
- Haque, R. (2007). Human Intestinal Parasites. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 25(4), 387. Retrieved from <https://goo.gl/5RMTsM>

- Haque, R., Roy, S., Kabir, M., Stroup, S. E., Mondal, D., & Houpt, E. R. (2005). Giardia Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(12), 2171–2173. <http://doi.org/10.1086/498169>
- Herrera, I. A. (2005). Giardiasis y desnutricion. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. (Vol. 44). Sociedad Boliviana de Pediatría. Retrieved from <https://goo.gl/ycDYdu>
- Hill, D. (1993). Giardiasis Issues in Diagnosis and Management. *Parasitic Diseases*, 503–525. Retrieved from <https://goo.gl/yXybgL>
- Huang, D. B., White, A. C., Thomas, E., & al., et. (2006). An updated review on Cryptosporidium and Giardia. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 291–314, viii. <http://doi.org/10.1016/j.gtc.2006.03.006>
- Isaac-Renton, J., & Sarafis, K. (1993). Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Method of Biotyping of Giardia duodenalis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(1), 134–144. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.134>
- Jacobsen, K. H., Ribeiro, P. S., Quist, B. K., & Rydbeck, B. V. (2007). Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 25(4), 399–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402182>
- JCarbonell, M. E., & Fernández-Alonso, B. (1996). Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. *An Esp Pediatr*, 44, 87–91. Retrieved from <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/44-2-1.pdf>
- Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J., & Svärd, S. G. (2010). Is human giardiasis caused by two different Giardia species? *Gut Microbes*, 1(6), 379–382. <http://doi.org/10.4161/gmic.1.6.13608>
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., & Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of Giardia duodenalis and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>

- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D., & Sogin, M. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for*. Retrieved from <https://goo.gl/LTyJyz>
- Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J. O., Svenungsson, B., & Svärd, S. G. (2011). Multilocus Genotyping of Human *Giardia* Isolates Suggests Limited Zoonotic Transmission and Association between Assemblage B and Flatulence in Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1262. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001262>
- Lebwohl, B., Deckelbaum, R., & Green, P. (2003). Giardiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*. Retrieved from <https://goo.gl/grW8XA>
- López, C., Rocío, C., & Francisco, O. (2012). Enfermedades emergentes y reemergentes. Retrieved from <https://goo.gl/4VELtf>
- Lujan, H. D. (2006). *Giardia* and giardiasis. *Medicina*, 66, 70–74. [http://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90219-8](http://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90219-8)
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., & Nash, T. E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(3), 294–304. Retrieved from <https://goo.gl/Ns8V9S>
- Luján, H. D., & Svärd, S. (2011). *Giardia: a model organism*. Springer. Retrieved from <https://goo.gl/7d1ybm>
- Mandel, G., Bennett, J., & Dolin, R. (2002). Enfermedades infecciosas principios y práctica. *Editorial Panamericana*. Retrieved from <https://goo.gl/xLBq7t>
- Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Y., & Sterling, C. R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), 67–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993859>
- McRoberts, K. M., Meloni, B. P., Morgan, U. M., Marano, R., Binz, N., Erlandsen, S. L., ... Thompson, R. C. A. (1996). Morphological and Molecular Characterization of *Giardia* Isolated from the Straw-Necked Ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *The Journal of Parasitology*, 82(5), 711. <http://doi.org/10.2307/3283880>

- Mejia, R., Vicuña, Y., Vaca, M., Cooper, P. J., Chico, M., Nutman, T. B., ... Sandoval, C. (2013). A Novel, Multi-Parallel, Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for Eight Gastrointestinal Parasites Provides Improved Diagnostic Capabilities to Resource-Limited At-Risk Populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1041–1047. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0726>
- Meloni, B. P., Thompson, R. C. A., Strandén, A. M., Köhler, P., & Eckert, J. (1991). Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Tropica*, 50(2), 115–124. [http://doi.org/10.1016/0001-706X\(91\)90004-4](http://doi.org/10.1016/0001-706X(91)90004-4)
- Monis, P. ., & Thompson, R. C. . (2003). Cryptosporidium and Giardia-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution*, 3(4), 233–244. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2003.08.003>
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., & Ey, P. L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1135–1144. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026204>
- Montoya, F. N., Bengoa, V. P., & Pinillos, D. M. B. (2005). Evaluación de técnicas para la conservación y cultivo de parásitos gastrointestinales en primates de vida silvestre. *Revista Medicina Veterinaria*, 0(9), 47–57. <http://doi.org/10.19052/MV.2081>
- Muhsen, K., & Levine, M. (2012). A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*. Retrieved from https://academic.oup.com/cid/article-abstract/55/suppl_4/S271/326211
- Müller, N., & von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*, 35(13), 1339–1347. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.008>
- OIE. (2012). Principios y Metodos de validacion de las pruebas de diagnostico de las enfermedades infecciosas. Retrieved from <https://goo.gl/xo9p8W>

- Olson, J., & Morrow, J. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*. Retrieved from <https://goo.gl/o4GKrb>
- Olson, M. E., O'Handley, R. M., Ralston, B. J., McAllister, T. A., & Andrew Thompson, R. . (2004). Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20(4), 185–191. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.015>
- OMS. (2003). Forjemos el futuro. Retrieved from http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_es.pdf
- OMS. (2015). Enfermedades infecciosas. WHO. Retrieved from http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
- Oña-Cisneros, F., García, D., Costta, M., Benavides, K., Villafuerte, W., Ipiates, G., ... Ruano, A. L. (2015). Prevalencia de parásitos intestinales y comparación de dos métodos diagnósticos en heces de niños escolares de tres parroquias del Distrito Metropolitano. *Researchgate.net*, 4(5), 16–26. Retrieved from <https://goo.gl/MLwqmF>
- Organización Mundial de la Salud. (1992). *Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica*. Ginebra: OMS. Retrieved from <https://goo.gl/LbWd4i>
- Orihel, T., Ash, L., & Ramachandran, C. (1997). Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. *Geneva. Organización*. Retrieved from <https://goo.gl/VrArWK>
- Ortega, Y. R., & Adam, R. D. (1997). Giardia: Overview and Update. *Clinical Infectious Diseases*, 25, 545–549. <http://doi.org/10.2307/4481156>
- Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra, S., & Thomas, R. (2008). Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*, 56(1), 45–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158403>
- Patricia, L., Velasquez, A., Del, M., Martinez, C., & Romero, A. C. (2009). Extracción y purificación de ADN. Retrieved from <https://goo.gl/m949zn>
- Patterson, B. A., & Mason, P. R. (1987). Epidemiology of Giardia Lamblia Infection in Children: Cross-Sectional and Longitudinal Studies in Urban and Rural

Communities in Zimbabwe. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), 277–282. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.277>

Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. (2010). Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5), 321–333. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>

Psifidi, A., Dovas, C. I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C. L., Arsenos, G., & Banos, G. (2015). Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. *PLOS ONE*, 10(1), e0115960. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115960>

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <http://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>

Read, C. M., Monis, P. T., & Thompson, R. C. A. (2004). Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(2), 125–130. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>

Restrepo, A. (2003). *Enfermedades infecciosas*. Corporación para Investigaciones Biológicas. Retrieved from <https://goo.gl/7v2Bsb>

Rivera, M., Parte, M., Hurtado, P., Magaldi, L., & Collazo, M. (2002). *Investigación clínica. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. Investigación Clínica* (Vol. 43). Retrieved from <https://goo.gl/4KBfP4>

Robertson, L. J., Forberg, T., Hermansen, L., Hamnes, I. S., & Gjerde, B. (2007). Giardia duodenalis cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by pcr-rflp and sequence analysis at two genes. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 576–585. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.576>

Rodriguez-Hidalgo, R., Geysen, D., Benítez-Ortiz, W., Geerts, S., & Brandt, J. (2002). Comparison of conventional techniques to differentiate between Taenia solium and Taenia saginata and an improved polymerase chain

- reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12s rDNA fragment. *Journal of Parasitology*, 88(5), 1007–1011. [http://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1007:COCTTD\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1007:COCTTD]2.0.CO;2)
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(4), pdb.ip66. <http://doi.org/10.1101/pdb.ip66>
- Ruano, A. L., López-Abán, J., Gajate, C., Mollinedo, F., De Melo, A. L., & Muro, A. (2012). Apoptotic mechanisms are involved in the death of *Strongyloides venezuelensis* after triggering of nitric oxide. *Parasite Immunology*, 34(12), 570–580. <http://doi.org/10.1111/pim.12004>
- Ruiz-Palacios, G., Gomez, M., Romieu, I., Cifuentes, E., Tellez-Rojo, M. M., Ruiz-Velazco, S., & Blumenthal, U. (2000). Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3), 388–392. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.388>
- Sackey, M.-E., Weigel, M. M., & Armijos, R. X. (2003). Predictors and Nutritional Consequences of Intestinal Parasitic Infections in Rural Ecuadorian Children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 49(1), 17–23. <http://doi.org/10.1093/tropej/49.1.17>
- Savioli, L., Bundy, D., & Tomkins, A. (1992). Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Of the Royal ...*. Retrieved from <https://goo.gl/DPNQso>
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–208. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>
- Schuurman, T., van Breda, A., de Boer, R., Kooistra-Smid, M., Beld, M., Savelkoul, P., & Boom, R. (2005). Reduced PCR Sensitivity Due to Impaired DNA Recovery with the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4616–4622. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4616-4622.2005>

- Simpson, A. G. B., Roger, A. J., Silberman, J. D., Leipe, D. D., Edgcomb, V. P., Jermin, L. S., Sogin, M. L. (2002). Evolutionary history of "early-diverging" eukaryotes: the excavate taxon *Carpodidomonas* is a close relative of *Giardia*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(10), 1782–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270904>
- Soliman, R. H., Fuentes, I., & Rubio, J. M. (2011). Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitology International*, 60(4), 507–511. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2011.09.006>
- Sprong, H., Cacciò, S. M., van der Giessen, J. W. B., Sterling, C., & Adam, R. (2009). Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12), e558. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000558>
- Stark, D., Barratt, J. L. N., van Hal, S., Marriott, D., Harkness, J., & Ellis, J. T. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 634–50. <http://doi.org/10.1128/CMR.00017-09>
- Stensvold, C. R., Lebbad, M., & Verweij, J. J. (2011). The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. *Trends in Parasitology*, 27(2), 53–58. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.005>
- Tang, Y., & Stratton, C. (2013). Advanced techniques in diagnostic microbiology. Retrieved from <https://goo.gl/QoETVQ>
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1–S5. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Tellez, A., Winiacka-krusnell, J., Paniagua, M., & Linder, E. (2003). Antibodies in Mother's Milk Protect Children Against Giardiasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(5), 322–325. <http://doi.org/10.1080/00365540310008041>
- Thompson, R. (2002). Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia*: the impact of molecular epidemiology. Retrieved from <http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/13953/>

- Thompson, R. C. A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 15–35. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.008>
- Thompson, S. C. (1994). *Giardia lamblia* in children and the child care setting: A review of the literature. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 30(3), 202–209. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1754.1994.tb00620.x>
- Tobie, J., Thomen, L. F., Sawitz, W., D'Antoni, J. S., Peres, C., Faust, E. C., ... Walker, J. H. (1938). A Critical Study of Clinical Laboratory Technics for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-18(2), 169–183. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1938.s1-18.169>
- Truant, A. L., Elliott, S. H., Kelly, M. T., & Smith, J. H. (1981). Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(5), 882–4. Retrieved from <https://goo.gl/1ukzbw>
- Tulu, B., Taye, S., & Amsalu, E. (2014). Prevalence and its associated risk factors of intestinal parasitic infections among Yadot primary school children of South Eastern Ethiopia: a cross-sectional. *BMC Research Notes*. Retrieved from <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-848>
- Vasoo, S., & Pritt, B. S. (2013). Molecular Diagnostics and Parasitic Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 461–503. <http://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.008>
- Vercruysse, J. (2005). Pharmacology, Chemotherapeutics: Anthelmintics. *The Merck Veterinary Manual, Ninth Ed. Published by*. Retrieved from <https://goo.gl/TwMrTp>
- Walker, N. J. (2002). A Technique Whose Time Has Come. *Science*, 296(5567). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/296/5567/557>
- WHO. (2013). The world health report 1996 - Fighting disease, fostering development. *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/whr/1996/en/>

- Winkworth, C. L., Learmonth, J. J., Matthaei, C. D., & Townsend, C. R. (2008). Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5100–5. <http://doi.org/10.1128/AEM.00232-08>
- Wong, S. S., Fung, K. S., Chau, S., Poon, R. W., Wong, S. C., & Yuen, K.-Y. (2014). Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why? *Experimental Biology and Medicine*, 239(11), 1443–1460. <http://doi.org/10.1177/1535370214523880>
- Wright, J. M., Dunn, L. A., Upcroft, P., & Upcroft, J. A. (2003). Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2(6), 529–541. <http://doi.org/10.1517/14740338.2.6.529>
- Yaoyu, F., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140. <http://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>

ANEXOS

ANEXO 1: Información para el participante

INFORMACION PARA EL VOLUNTARIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE EL PROYECTO

“DETERMINAR LA PREVALENCIA GENERAL DE LAS PARASITOSIS DESATENDIDAS EN EL ECUADOR: PROTOZOARIOS Y HELMINTOS”

(Anexo consentimiento informado)

Usted o/y su representado/a ha sido considerado para participar en el presente proyecto, que se realizará a nivel nacional. Se le ha pedido que participe porque se considera que usted es representativo de la población del Ecuador. El propósito de este documento es explicarle en que consiste el estudio para ayudarle a tomar una decisión sobre la invitación a participar en el mismo.

Propósito en el estudio

Las infecciones por parásitos constituyen una amenaza para la salud de las personas que los tienen, afectando a diferentes órganos del cuerpo dependiendo del tipo de organismo que lo parasita. Estas enfermedades se transmiten por varias vías, una de las principales es los malos hábitos diarios de limpieza, así como también el convivir en condiciones no adecuadas con animales infectados. La existencia del parásito es decir el diagnóstico se puede realizar analizando una muestra de sangre, de orina y principalmente de heces (deposición, excremento, caca), en busca de la presencia de estos parásitos en su cuerpo, mediante el uso de exámenes basados en tecnología tradicional y de nueva generación, este diagnóstico permitirá elaborar nuevas estrategias destinadas al control, eliminación y tratamiento de estas enfermedades, tanto a nivel individual (cada persona), así como a nivel colectivo (toda su familia, vecinos y comunidad)

Procedimiento

Si decide participar en el estudio, se le solicitará una muestra de heces y orina, para lo cual se le indicará la técnica adecuada para la recolección de muestras, así como se le proveerá de los materiales requeridos para el proceso. De forma adicional, le solicitará la donación de una muestra de 5 a 10 ml de sangre, la cual será tomada por personal calificado, formado, con experiencia y capacitado con las normativas específicas para desarrollar los diferentes procedimientos necesarios para esta investigación.

Beneficios, riesgos y molestias

El proyecto brindará una capacitación a la comunidad incluida en el estudio sobre los efectos de ser portador de parásitos, así como, se informará sobre hábitos alimenticios adecuados previa la colecta de las muestras para facilitar el proceso y normas de aseo y manipulación de alimentos y desechos que pretenden ayudar a que usted sepa cómo evitar las infecciones por parásitos para controlarlas en su hogar y en la comunidad.

Los riesgos y molestias físicas causadas por la colecta de las muestras de heces y orina, así como la extracción de sangre en este estudio son las que se presentan en cualquier colecta muestras y extracción de una muestra de sangre de vena periférica, que usted seguramente ya experimentado previamente. Así pues, puede experimentar un ligero dolor, enrojecimiento o irritación del área de la que se extrajo la sangre, que desaparecen unos minutos después del procedimiento.

REVISION DE DOCUMENTOS ORIGINALES, CONFIDENCIALIDAD Y PROTECCION DE LOS DATOS PERSONALES.

Participación voluntaria

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede retirarse en cualquier momento. Debe comprender que el programa PROPAD puede retirarle del estudio sin su consentimiento por incumplimiento suyo a las instrucciones impartidas en el estudio, u otras razones, justificadas razonablemente en el campo médico.

Información y muestras codificadas

Para proteger su confidencialidad, sus muestras y resultados serán registrados con un código, sin nombres ni datos de identificación. Los integrantes del equipo de investigadores guardarán el archivo con la vinculación de este código con su nombre, pero este no aparecerá bajo ningún motivo en cualquier producto relacionado con la presente investigación.

Almacenamiento y análisis posteriores de las muestras

El INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública) almacenará sus muestras junto con otros procedentes de este estudio, y las mismas serán utilizadas solo para el propósito establecido en este documento. En todo momento las muestras se almacenarán en un lugar seguro, y se exigirá que las personas que trabajen con sus muestras respeten la confidencialidad de su información y resultados.

Compromisos adquiridos por el Proyecto de Investigación

El equipo de investigadores de este proyecto, luego de la colecta y análisis de las muestras se comprometen a elaborar un informe con los resultados encontrados, el que será entregado a la dirección de la escuela y al centro de salud responsable del control sanitario de su institución educativa, en un período no mayor de 3 semanas después de realizada la visita a su comunidad.

Aspectos comerciales

Usted no recibirá ninguna compensación económica por la participación de este estudio

Personal de contacto para el estudio

Si tiene preguntas acerca de esta investigación, sobre cualquier daño relacionado con la extracción de sangre o sobre su retirada del estudio, debe contactarse en cualquier momento con la Doctora Ana Lucía Ruano al número 0997414347, directora del Programa Nacional para el abordaje multidisciplinario de las Parasitosis desatendidas en el Ecuador.

ANEXO 2: Consentimiento informado

Consentimiento Informado

Código:

--	--	--	--	--

FECHA:

--	--

/

--	--

mes

--	--

año

Yo _____ (nombre completo), Cédula de identidad No _____, mayor de edad, de nacionalidad _____, con domicilio en _____, representante legal del niño _____, autorizo a los investigadores designados por la Dra. Ana Lucía Ruano, Directora del programa PROPAD (Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las parasitosis desatendidas en el Ecuador) a realizar los procedimientos requeridos para coleccionar una muestra de heces, orina y una muestra de sangre de 5 a 10 ml.

Declaro haber leído las hojas de información (2 páginas) que se me han entregado, haber podido hacer preguntas, y las realizadas han sido contestadas satisfactoriamente, recibido suficiente información, hablado con los investigadores, tenido tiempo suficiente para considerar de manera adecuada mi participación en el mismo, comprendido que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando desee y sin tener que dar explicaciones.

Al firmar este documento doy libremente mi conformidad para participar en el estudio y las pruebas incluidas en el mismo.

Firma del Participante

Firma del investigador

ANEXO 3: Encuesta

Código: - - Fecha:
 DPA Parroquia Esc. Paralelo niño día mes año

DATOS PERSONALES

NOMBRE		EDAD	
PROVINCIA			
CANTON			
PARROQUIA			
ESCUELA		AMIE	
DIRECCIÓN DE DOMICILIO		NO. DE TELEFONO	

Marque UNA SOLA X en la respuesta a cada pregunta.

SECCIÓN SOCIOECONÓMICA

En las preguntas que contienen opción de respuesta marque con una X la de su

1. NIVEL DE EDUCACIÓN

1. ¿Cuál es el nivel de instrucción del jefe del hogar?

Sin estudios	
Primaria incompleta	
Primaria completa	
Secundaria incompleta	
Secundaria completa	
Hasta 3 años de educación superior	
4 ó más años de educación superior (sin post grado)	
Post grado	

2. ACTIVIDAD ECONÓMICA DEL HOGAR

1. ¿De dónde viene el agua que consume?

Potable	
Entubada no potable	

Pozo	
Agua de ríos, vertientes, acequia.	
Agua de lluvia	
Conectado a red pública de alcantarillado	
¿Cuál es el tipo de vivienda?	
Suite de lujo	
Cuarto(s) en casa de inquilinato	
Departamento en casa o edificio	
Casa/Villa	
Mediagua	
Rancho	
Choza/ Covacha/Otro	
4. HÁBITOS	
¿En qué situaciones acostumbra a lavarse las manos? (RESPUESTA MÚLTIPLE)	
Antes de preparar alimentos	
Antes de ingerir alimentos	
Después de ir al baño	
No se lava las manos	

DPA Parroquia

Esc.

Paralelo niño

ANEXO 4: Hoja de Resultados

		NIÑO DE 7MO					
PARÁSITOS		COPRO	K/K	BAERMANN	COPRO	K/K	BAERMANN
PROTOZOARIOS	COMPLEJO DISPAR		-	-		-	-
	GIARDIA LAMBLIA		-	-		-	-
	IODAMOEBIA BUTSCHLI		-	-		-	-
	ENTEROBIUS VERMICULARIS		-	-		-	-
	ENDOLIMAX NANA		-	-		-	-
	BLASTOCYSTIS HOMINIS		-	-		-	-
	EMBADOMONA INTESTINALES		-	-		-	-
	CHILOMASTIX MESNILI		-	-		-	-
NEMATODOS	ANCYLOSTOMA DUODENALE						
	ASCARIS LUMBRICOIDES						
	TRICURIS TRICHURA						
	ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS						

CÉSTODO	TAENIA SOLIUM						
	TAENIA SAGINATA						
TREM.	FASCIOLA HEPÁTICA						
OTROS							

OBSERVACIONES GENERALES:

TÉCNICO RESPONSABLE

ANEXO 5: Parámetros de ADN obtenidos por espectrofotometría en muestras conservadas en etanol 70%

Codigo	Concentracion ng/uL	260/280	260/230	Codigo	Concentracion ng/uL	260/280	260/230
6_E	132.60	1.52	0.62	84_E	128.60	1.71	0.89
7_E	105.40	1.55	0.68	85_E	82.00	1.79	0.63
8_E	125.70	1.64	0.79	87_E	129.70	1.69	0.70
11_E	76.50	1.59	0.71	88_E	235.10	1.55	0.50
12_E	121.90	1.54	0.68	89_E	126.10	1.67	0.62
13_E	138.20	1.57	0.68	90_E	74.80	1.63	0.69
14_E	156.00	1.50	0.69	91_E	151.30	1.59	0.73
17_E	112.90	1.63	0.76	92_E	166.40	1.62	0.72
19_E	137.70	1.53	0.67	93_E	113.30	1.59	0.76
20_E	110.30	1.56	0.72	95_E	101.50	1.65	0.80
24_E	167.50	1.78	0.99	96_E	157.30	1.74	0.89
25_E	228.80	1.58	0.81	97_E	139.40	1.68	0.80
26_E	194.30	1.72	0.96	98_E	60.80	1.75	0.79
27_E	91.70	1.58	0.66	99_E	115.60	1.67	0.80
28_E	166.90	1.70	0.90	101_E	189.60	1.74	0.93
29_E	153.60	1.51	0.74	104_E	138.90	1.77	1.01
30_E	131.20	1.52	0.65	105_E	247.70	1.66	0.88
31_E	86.10	1.52	0.63	106_E	114.60	1.74	0.95
32_E	34.40	1.52	1.00	107_E	93.30	1.66	0.75
33_E	115.00	1.59	0.73	108_E	199.20	1.60	0.67
34_E	64.50	1.52	0.69	110_E	77.00	1.61	0.80
35_E	11.00	1.77	0.50	113_E	155.80	1.55	0.66
36_E	187.40	1.60	0.68	117_E	170.30	1.64	0.80
37_E	233.20	1.48	0.64	118_E	219.80	1.55	0.65
38_E	50.00	1.75	0.81	119_E	36.40	1.78	0.85
42_E	248.60	1.55	0.71	120_E	130.30	1.77	0.90
44_E	99.90	1.68	0.88	121_E	207.20	1.54	0.64
46_E	37.10	1.61	0.82	122_E	90.40	1.62	0.71
47_E	425.80	1.24	0.46	123_E	159.50	1.93	1.18
48_E	480.20	1.37	0.51	124_E	90.80	1.84	0.87
49_E	249.70	1.60	0.76	125_E	35.60	1.59	0.69
50_E	108.00	1.71	0.91	127_E	193.70	1.69	0.78
53_E	127.37	1.63	0.84	128_E	149.30	1.59	0.68
54_E	121.51	1.58	0.69	130_E	77.20	1.49	0.60
57_E	127.17	1.57	0.85	131_E	198.90	1.74	0.93
59_E	96.93	1.66	0.85	132_E	85.50	1.63	0.66
60_E	221.83	1.41	0.63	133_E	99.20	1.76	1.03
62_E	159.03	1.75	1.04	134_E	125.00	1.56	0.79
63_E	159.00	1.73	0.94	135_E	86.90	1.65	0.90
64_E	107.10	1.59	0.80	136_E	148.10	1.59	0.69
65_E	44.40	1.65	0.74	137_E	98.10	1.70	1.05
67_E	52.30	1.73	0.74	138_E	149.30	1.76	0.99
68_E	55.00	1.59	0.67	139_E	73.40	1.77	0.94
71_E	99.00	1.64	0.73	143_E	120.70	1.58	0.66
73_E	78.40	1.56	0.67	144_E	156.10	1.61	0.74
75_E	34.20	1.81	0.93	145_E	112.90	1.60	0.70
77_E	187.50	1.54	0.66	146_E	236.10	1.69	0.76
78_E	158.20	1.60	0.71	147_E	96.30	1.60	0.76
79_E	448.30	1.63	0.69	148_E	231.35	1.41	0.56
80_E	420.30	1.53	0.60	149_E	88.55	1.68	0.92
82_E	402.60	1.91	1.32	151_E	66.25	1.70	0.93

152_E	308.70	1.45	0.57	227_E	58.90	1.51	0.65
153_E	219.05	1.48	0.60	228_E	62.25	1.68	0.81
154_E	122.40	1.52	0.65	229_E	74.45	1.66	0.88
155_E	121.51	1.60	0.76	230_E	136.50	1.44	0.67
156_E	160.10	1.73	0.85	231_E	111.20	1.47	0.70
157_E	197.60	1.57	0.69	232_E	119.90	1.46	0.61
158_E	219.15	1.70	0.85	234_E	60.30	1.63	0.68
159_E	110.90	1.86	1.21	235_E	99.10	1.60	0.70
160_E	140.05	1.58	0.83	237_E	89.40	1.59	0.68
161_E	427.40	1.38	0.52	239_E	170.10	1.59	0.73
162_E	68.40	1.63	0.89	240_E	132.10	1.59	0.75
163_E	95.15	1.64	0.74	242_E	123.20	1.64	0.77
164_E	130.20	1.79	1.08	243_E	90.95	1.51	0.68
165_E	165.05	1.55	0.66	244_E	99.20	1.48	0.64
166_E	74.80	1.58	0.63	245_E	101.10	1.53	0.65
167_E	64.20	1.70	0.56	246_E	98.80	1.54	0.70
168_E	75.40	1.60	0.68	247_E	170.60	1.52	0.73
169_E	76.40	1.80	0.87	248_E	134.50	1.49	1.05
171_E	182.10	1.62	0.76	249_E	136.20	1.50	1.16
172_E	40.95	1.83	0.65	250_E	163.60	1.48	1.07
173_E	39.95	1.73	0.80	251_E	170.90	1.49	1.16
174_E	80.30	1.54	0.62	252_E	145.20	1.51	1.15
175_E	57.20	1.82	0.68	253_E	64.40	1.56	0.96
176_E	86.80	1.69	0.83	255_E	214.40	1.53	0.76
180_E	110.35	1.33	0.45	256_E	169.60	1.58	0.88
181_E	92.20	1.68	0.84	257_E	216.10	1.51	0.80
182_E	57.50	1.68	0.62	258_E	209.80	1.55	0.82
184_E	48.10	1.75	0.58	259_E	157.00	1.58	0.90
187_E	133.60	1.49	1.31	260_E	184.90	1.56	0.90
188_E	117.20	1.49	1.27	261_E	156.10	1.54	0.74
190_E	19.80	1.75	1.24	262_E	207.80	1.53	0.90
191_E	37.80	1.57	0.87	265_E	160.60	1.55	0.94
192_E	62.50	1.58	0.90	266_E	240.60	1.51	1.00
193_E	54.00	1.61	1.10	267_E	210.60	1.49	1.01
195_E	95.10	1.49	0.95	268_E	234.10	1.49	1.01
196_E	54.60	1.53	1.13	269_E	180.50	1.56	0.89
198_E	81.10	1.50	1.00	271_E	233.30	1.47	1.08
199_E	112.30	1.54	0.98	272_E	182.40	1.57	1.07
200_E	85.60	1.58	0.93	273_E	296.10	1.48	1.02
201_E	154.10	1.48	1.12	274_E	290.60	1.49	0.95
202_E	169.10	1.53	1.19	275_E	294.30	1.48	1.13
204_E	107.60	1.64	0.77	279_E	185.00	1.56	1.06
206_E	195.50	1.46	0.75	281_E	211.70	1.50	1.09
207_E	134.80	1.50	0.75	282_E	70.60	2.14	0.92
210_E	37.85	1.69	0.88	283_E	93.70	1.90	1.04
211_E	31.05	1.71	0.98	284_E	85.90	2.06	1.05
215_E	32.80	1.54	0.98	285_E	119.40	2.02	0.99
216_E	71.45	1.82	1.09	286_E	121.51	1.60	0.76
217_E	113.45	1.80	1.10	287_E	60.10	2.08	1.25
218_E	83.30	1.62	0.81	288_E	160.20	1.70	0.79
220_E	108.50	1.44	0.54	289_E	186.70	1.71	0.82
221_E	123.80	1.50	0.57	290_E	223.90	1.60	0.69
222_E	80.10	1.55	0.63	291_E	146.40	1.64	0.67
223_E	88.80	1.51	0.60	292_E	102.20	1.72	0.70
224_E	51.90	1.55	0.73	297_E	125.40	1.73	0.74
226_E	57.50	1.50	0.61	300_E	97.20	1.68	0.75
303_E	114.60	1.67	0.72	394_E	19.10	1.94	0.73
304_E	72.10	1.75	0.82	395_E	50.30	1.80	0.92
305_E	95.60	1.71	0.79	398_E	163.85	1.70	0.92
306_E	69.80	1.65	0.75	399_E	110.80	1.67	0.96

307_E	71.40	1.90	0.85	400_E	105.70	1.61	0.83
308_E	101.10	1.69	0.71	401_E	114.00	1.55	0.65
309_E	79.70	1.80	0.84	402_E	136.95	1.62	0.85
312_E	56.90	1.78	0.73	407_E	180.15	1.65	0.93
316_E	100.40	1.58	0.83	411_E	112.20	1.69	0.93
317_E	183.90	1.49	0.74	412_E	144.63	1.55	0.71
318_E	53.30	2.02	0.93	413_E	100.80	1.64	0.84
319_E	363.50	1.47	0.65	414_E	87.00	1.64	0.91
320_E	66.30	1.85	0.84	417_E	117.70	1.60	0.80
321_E	66.87	1.72	0.90	420_E	225.60	1.60	0.83
322_E	106.23	0.83	0.61	422_E	67.30	1.61	0.84
323_E	58.43	1.76	0.87	424_E	111.60	1.69	0.89
324_E	36.70	1.67	1.19	425_E	84.80	1.69	1.01
326_E	34.17	1.76	1.16	426_E	96.80	1.72	1.01
328_E	245.20	1.49	0.82	542_E	126.30	1.58	0.79
329_E	400.30	1.48	0.67	544_E	141.20	1.59	0.81
330_E	185.00	1.42	0.57	545_E	252.35	1.78	0.94
333_E	118.05	1.68	0.89	546_E	133.67	1.62	0.87
334_E	130.25	1.51	0.89	547_E	174.00	1.62	0.91
335_E	421.90	1.36	0.55	548_E	82.40	1.59	0.89
337_E	101.90	1.51	0.90	550_E	182.60	1.62	0.85
339_E	409.88	1.71	0.92	551_E	169.50	1.65	0.90
340_E	181.90	1.45	0.65	554_E	261.15	1.81	1.18
341_E	236.30	1.50	0.50	555_E	160.10	1.69	0.93
343_E	240.10	1.68	0.77	556_E	164.00	1.50	0.71
345_E	279.55	1.51	0.70	557_E	81.25	1.71	0.89
346_E	421.00	1.41	0.54	558_E	101.70	1.63	0.85
348_E	95.10	2.10	0.79	559_E	60.10	1.77	0.80
350_E	149.90	1.33	0.87	560_E	112.60	1.61	0.82
353_E	93.30	2.11	0.79	561_E	214.00	1.61	0.86
355_E	100.00	2.00	0.80	562_E	113.55	1.55	0.61
356_E	310.00	1.45	0.94	566_E	82.70	1.44	0.56
357_E	80.00	2.50	0.75	567_E	93.70	1.57	0.53
358_E	110.00	1.82	0.82	568_E	64.05	1.61	0.66
359_E	107.80	1.86	0.81	569_E	92.70	1.51	0.59
360_E	169.40	1.18	0.88	570_E	48.10	1.61	0.60
361_E	132.20	1.51	0.85	572_E	133.25	1.59	0.70
362_E	164.10	1.22	0.88	573_E	40.00	1.68	0.47
364_E	196.85	1.50	0.80	578_E	25.60	1.62	0.47
365_E	149.40	1.65	1.11	581_E	61.10	1.59	0.55
367_E	164.50	1.47	0.71	582_E	9.60	1.79	0.41
369_E	165.75	1.67	0.97	588_E	118.30	1.53	0.65
373_E	160.00	1.59	0.85	589_E	51.30	1.72	0.65
374_E	175.35	1.64	1.06	593_E	139.17	1.49	0.55
378_E	84.50	1.61	0.80	595_E	28.00	1.67	0.54
380_E	237.90	1.51	0.70	596_E	50.00	1.65	0.54
381_E	126.30	1.66	1.04	599_E	59.60	1.61	0.60
383_E	117.20	1.58	0.87	600_E	101.90	1.61	0.73
384_E	138.60	1.45	0.62	603_E	43.70	1.56	0.61
385_E	134.55	1.73	1.05	604_E	12.85	1.88	0.43
390_E	180.30	1.63	0.92	605_E	48.40	1.58	0.61
392_E	112.25	1.63	0.88	607_E	60.75	1.56	0.60
609_E	69.90	1.52	0.56	683_E	19.00	1.67	0.64
610_E	92.70	1.47	0.50	684_E	44.90	1.56	0.61
611_E	39.90	1.63	0.64	686_E	59.70	1.55	0.68
612_E	36.10	1.67	0.58	687_E	73.95	1.45	0.66

613_E	36.50	1.77	0.54	688_E	85.35	1.50	0.66
614_E	42.10	1.77	0.61	690_E	98.40	1.46	0.59
616_E	29.20	1.70	0.71	696_E	34.80	1.55	0.65
617_E	34.40	1.62	0.59	697_E	48.00	1.59	0.63
618_E	43.80	1.56	0.84	698_E	239.70	1.41	0.58
620_E	39.00	1.53	0.65	699_E	98.40	1.42	0.52
621_E	59.00	1.60	0.78	700_E	72.20	1.45	0.54
622_E	68.83	1.71	1.01	703_E	24.00	1.61	0.64
623_E	33.35	1.54	0.65	705_E	84.85	1.52	0.52
624_E	52.30	1.55	0.86	706_E	46.00	1.59	0.59
626_E	41.45	1.50	0.88	708_E	59.20	1.49	0.44
627_E	23.75	1.54	0.75	710_E	29.30	1.51	0.58
630_E	81.85	1.56	0.72	711_E	90.30	1.55	0.67
631_E	30.60	1.47	0.71	712_E	54.65	1.50	0.60
632_E	67.80	1.60	0.70	714_E	6.95	2.13	0.60
634_E	31.45	1.59	0.69	715_E	9.50	2.11	0.50
636_E	66.10	1.56	0.65	716_E	10.85	1.91	0.61
637_E	86.23	1.45	0.65	718_E	19.65	1.71	0.61
638_E	63.23	1.60	0.67	719_E	17.00	1.71	0.53
639_E	49.57	2.09	0.69	720_E	22.85	1.58	0.71
640_E	34.35	1.58	0.56	722_E	10.65	1.74	0.57
641_E	54.20	1.45	0.58	723_E	44.25	1.59	0.65
642_E	39.55	1.62	0.59	724_E	43.25	1.49	0.55
643_E	121.51	1.60	0.76	725_E	39.73	1.66	0.81
644_E	30.50	1.54	0.78	726_E	17.00	1.57	0.73
645_E	92.20	1.45	0.55	727_E	34.90	1.60	0.53
647_E	53.20	1.50	0.64	Promedio:	117.29	1.61	0.77
648_E	36.45	1.55	0.62				
649_E	34.60	1.56	0.68				
650_E	39.50	1.61	0.65				
651_E	73.90	1.49	0.50				
652_E	18.20	1.60	0.56				
653_E	54.05	1.53	0.57				
654_E	38.95	1.56	0.70				
655_E	80.65	1.42	0.51				
658_E	26.45	1.51	0.62				
659_E	33.15	1.57	0.63				
660_E	67.85	1.47	0.60				
662_E	23.70	1.65	0.65				
665_E	84.70	1.48	0.61				
666_E	72.05	1.48	0.59				
667_E	70.25	1.55	0.65				
668_E	90.70	1.55	0.60				
669_E	65.65	1.44	0.64				
670_E	46.60	1.45	0.57				
671_E	21.50	1.66	0.59				
673_E	61.35	1.51	0.69				
675_E	11.85	1.87	0.67				
677_E	102.40	1.43	0.58				
679_E	40.85	1.61	0.57				
681_E	44.50	1.57	0.55				
682_E	94.20	1.49	0.56				

ANEXO 6: Parámetros de ADN obtenidos por espectrofotometría en muestras conservadas en dicromato de potasio 2.5%.

Código	Concentración ng/uL	260/280	260/230	Código	Concentración ng/uL	260/280	260/230
6_D	123.40	1.79	1.03	84_D	136.70	1.42	0.75
7_D	92.50	1.73	0.99	85_D	146.60	1.81	0.83
8_D	143.20	1.75	1.04	87_D	69.50	2.01	0.73
11_D	79.60	1.72	0.96	88_D	52.60	2.09	0.58
12_D	173.60	1.76	1.04	89_D	60.80	1.96	0.74
13_D	145.70	1.64	0.83	90_D	140.10	1.58	0.63
14_D	69.70	1.41	0.59	91_D	61.20	1.72	0.77
17_D	111.40	1.70	0.80	92_D	78.70	2.06	0.62
19_D	112.70	1.73	0.85	93_D	101.10	1.64	0.70
20_D	84.40	1.72	0.98	95_D	122.30	1.63	0.70
24_D	158.10	1.78	1.00	96_D	159.80	1.78	1.08
25_D	176.00	1.65	0.83	97_D	113.90	1.75	0.93
26_D	282.80	1.64	0.87	98_D	48.20	1.69	0.77
27_D	74.50	1.70	0.87	99_D	96.50	1.67	0.54
28_D	128.70	1.62	0.76	101_D	135.00	1.72	0.92
29_D	207.20	1.56	0.78	104_D	160.10	1.75	0.91
30_D	103.00	1.64	0.76	105_D	116.30	1.83	1.03
31_D	43.60	1.65	0.79	106_D	76.80	1.77	0.88
32_D	114.00	1.77	1.07	107_D	134.50	1.74	0.80
33_D	93.10	1.74	1.08	108_D	89.20	1.83	0.86
34_D	99.70	1.67	1.01	110_D	39.60	1.86	0.72
35_D	74.60	1.73	0.94	113_D	148.90	1.91	1.04
36_D	149.90	1.80	1.00	117_D	51.90	1.71	0.77
37_D	53.80	1.71	1.09	118_D	52.60	1.78	0.95
38_D	107.10	1.73	1.03	119_D	90.20	1.87	1.01
42_D	127.50	1.88	0.90	120_D	98.60	1.78	0.80
43_D	142.70	1.81	1.09	121_D	80.50	1.95	0.97
44_D	70.80	1.79	0.98	122_D	94.50	1.66	0.71
46_D	121.90	1.75	1.07	123_D	79.00	1.53	0.57
47_D	176.00	1.69	0.91	124_D	106.30	1.94	1.07
48_D	106.90	1.69	0.93	125_D	64.20	1.83	0.85
49_D	80.90	1.83	1.18	127_D	136.70	1.76	0.95
50_D	137.10	1.80	1.11	128_D	72.90	1.83	1.14
53_D	99.30	1.73	1.14	130_D	61.60	1.76	0.86
54_D	146.53	1.69	1.02	131_D	109.60	1.70	0.81
57_D	166.77	1.60	0.93	132_D	71.30	1.73	0.82
59_D	125.85	1.76	1.18	133_D	131.30	1.84	1.03
60_D	175.05	1.67	1.07	134_D	160.10	1.73	0.88
62_D	181.00	1.75	1.18	135_D	75.30	1.77	0.86
63_D	136.27	1.71	0.98	136_D	105.40	1.68	0.71
64_D	78.30	1.69	0.84	137_D	107.60	1.65	0.78
65_D	51.90	1.87	0.86	138_D	161.10	1.88	1.26
67_D	52.10	1.84	0.80	139_D	109.70	1.70	0.77
68_D	148.00	1.62	0.71	141_D	90.50	1.72	0.80
71_D	80.70	1.94	0.98	143_D	86.80	1.69	0.87
73_D	68.80	1.70	0.89	144_D	76.30	1.72	0.88
75_D	97.80	1.84	1.09	145_D	118.40	1.71	0.83
77_D	139.00	1.64	0.80	146_D	149.20	1.81	1.00
78_D	80.80	1.66	0.87	147_D	76.80	1.81	1.08
79_D	91.00	1.83	1.08	148_D	136.00	1.86	1.16
80_D	117.50	1.78	1.00	149_D	154.05	1.89	1.25
82_D	116.10	1.83	1.09	150_D	212.35	1.89	1.32

151_D	60.60	1.66	0.78	226_D	213.10	1.95	1.34
152_D	109.07	1.75	0.93	227_D	231.40	1.96	1.42
153_D	159.90	1.76	0.93	228_D	181.90	1.87	1.24
154_D	80.35	1.87	1.29	229_D	146.95	1.82	1.15
155_D	166.45	1.62	0.72	230_D	137.35	1.82	1.16
156_D	127.03	1.84	1.07	231_D	139.10	1.87	1.30
157_D	167.20	1.70	0.79	232_D	138.00	1.86	1.28
158_D	128.95	1.81	1.09	234_D	176.20	1.85	1.28
159_D	97.57	1.76	0.92	235_D	191.50	1.83	1.27
160_D	187.03	1.86	1.21	237_D	101.30	1.82	1.25
161_D	57.20	1.69	0.82	239_D	64.90	1.67	1.02
162_D	55.55	1.62	0.59	240_D	100.20	1.78	1.00
163_D	146.07	1.51	0.64	242_D	121.30	1.78	1.05
164_D	135.85	1.79	0.92	243_D	163.63	1.73	0.93
165_D	75.80	1.69	0.75	244_D	118.20	1.77	0.98
166_D	73.40	1.93	1.19	245_D	142.10	1.82	1.04
167_D	50.50	1.77	0.61	246_D	151.70	1.79	1.07
168_D	77.50	1.55	0.61	247_D	112.20	1.79	1.06
169_D	55.40	1.75	0.71	248_D	115.45	1.73	0.92
171_D	81.20	1.87	0.97	249_D	156.40	1.75	1.32
172_D	140.30	1.59	0.66	250_D	122.90	1.85	1.42
173_D	80.90	1.84	0.80	251_D	118.70	1.86	1.21
174_D	43.70	1.75	0.69	252_D	103.80	1.69	1.16
175_D	46.60	1.70	0.62	253_D	99.70	1.84	1.32
176_D	81.50	1.92	0.95	255_D	172.00	1.71	1.20
180_D	34.00	1.79	0.74	256_D	166.10	1.75	0.92
181_D	107.50	1.97	1.22	257_D	139.30	1.83	1.13
182_D	60.70	1.89	0.91	258_D	245.80	1.73	0.96
184_D	83.90	1.83	0.79	259_D	64.80	1.93	1.03
187_D	58.35	1.87	1.19	260_D	181.40	1.80	1.04
188_D	64.50	1.75	0.94	261_D	273.70	1.77	1.02
190_D	115.50	1.68	1.10	262_D	41.95	1.91	0.95
191_D	195.00	1.90	1.31	265_D	106.10	1.89	1.11
192_D	105.40	1.95	1.35	266_D	65.80	1.94	1.19
193_D	141.70	1.91	1.41	267_D	109.20	1.89	1.11
195_D	120.10	1.77	0.91	268_D	109.60	1.88	1.06
196_D	42.90	1.65	1.21	269_D	77.30	1.79	1.06
198_D	111.00	1.83	0.97	271_D	131.40	1.93	1.21
199_D	224.00	1.74	1.08	272_D	118.20	1.92	1.11
200_D	97.80	1.70	1.02	273_D	79.10	1.92	1.13
201_D	115.45	1.73	0.92	274_D	162.40	1.84	1.13
202_D	115.45	1.73	0.92	275_D	122.40	1.86	1.27
204_D	95.20	1.83	0.94	279_D	136.20	1.85	1.22
206_D	140.30	1.85	1.17	281_D	81.30	2.01	1.15
207_D	135.00	1.59	0.83	282_D	59.70	1.77	1.06
210_D	169.50	1.83	1.11	283_D	167.60	1.85	0.99
211_D	92.90	1.85	1.13	284_D	193.80	1.96	0.88
215_D	132.80	1.83	1.15	285_D	145.70	0.95	0.69
216_D	192.70	1.92	1.38	286_D	114.10	1.82	1.05
217_D	93.25	1.78	1.03	287_D	95.20	1.56	0.79
218_D	131.00	1.85	1.00	288_D	59.00	1.79	1.03
220_D	106.20	1.92	1.00	289_D	131.20	1.76	0.99
221_D	229.40	1.90	1.23	290_D	148.20	1.71	0.87
222_D	229.20	1.92	1.30	291_D	131.50	1.80	0.99
223_D	138.40	1.93	1.11	292_D	169.80	1.80	1.00
224_D	104.80	1.83	0.99	297_D	97.00	1.83	0.95

300_D	142.10	1.73	0.93	392_D	118.75	1.59	0.78
303_D	101.80	1.80	1.10	394_D	79.15	1.68	0.88
304_D	142.60	1.73	0.90	395_D	231.50	1.89	1.32
305_D	144.50	1.80	0.98	398_D	105.40	1.69	1.02
306_D	146.30	1.75	0.97	399_D	123.95	1.72	0.90
307_D	167.80	1.78	1.04	400_D	161.95	1.74	1.01
308_D	173.80	1.86	1.15	401_D	165.85	1.73	1.18
309_D	110.20	1.77	0.91	402_D	199.45	1.79	1.24
312_D	115.45	1.73	0.92	407_D	203.30	1.86	1.41
316_D	115.45	1.73	0.92	411_D	242.05	1.82	1.26
317_D	61.05	1.82	0.75	412_D	82.97	1.69	1.01
318_D	90.80	1.79	0.93	413_D	89.30	1.75	1.29
319_D	81.17	1.86	0.81	414_D	122.30	1.84	1.21
320_D	115.90	1.56	0.79	415_D	154.50	1.67	0.93
321_D	48.55	1.60	0.66	417_D	189.30	1.75	1.02
322_D	85.00	1.52	0.86	420_D	88.75	1.71	1.11
323_D	344.05	1.47	0.65	422_D	100.30	1.74	0.98
324_D	729.01	1.32	0.49	424_D	115.40	1.60	0.74
326_D	102.95	1.65	0.80	425_D	84.50	1.78	1.01
328_D	118.33	1.61	0.79	426_D	100.20	1.70	0.73
329_D	82.20	1.67	0.99	542_D	129.10	1.54	0.78
330_D	83.33	1.61	0.97	544_D	91.70	1.62	0.79
333_D	124.72	1.81	1.34	545_D	73.80	1.73	0.96
334_D	69.00	1.72	1.21	546_D	161.50	1.71	0.97
335_D	85.77	1.72	1.25	547_D	100.70	2.30	0.63
337_D	34.00	1.71	1.15	548_D	157.40	1.63	0.80
339_D	124.37	1.72	0.76	550_D	170.00	1.76	0.97
340_D	48.63	1.75	0.98	551_D	145.50	1.78	1.05
341_D	75.70	1.93	0.97	554_D	116.10	1.81	1.14
343_D	94.50	1.79	1.08	555_D	65.60	1.69	0.98
345_D	131.50	1.74	0.82	556_D	65.50	1.70	0.96
346_D	127.77	1.63	0.85	557_D	102.80	1.65	0.72
348_D	116.20	1.72	0.83	558_D	145.30	1.87	1.02
350_D	115.50	1.73	0.83	559_D	123.80	1.87	1.08
353_D	93.70	2.13	0.79	560_D	131.30	1.71	0.81
355_D	100.00	2.00	0.80	561_D	138.30	1.61	0.73
356_D	200.00	1.00	0.90	562_D	172.50	1.71	0.79
357_D	130.00	1.54	0.85	566_D	47.50	1.87	0.94
358_D	124.40	1.61	0.84	567_D	88.70	1.93	1.03
359_D	186.70	1.07	0.89	568_D	141.80	1.79	0.92
360_D	128.40	1.56	0.84	569_D	35.20	1.83	0.98
361_D	124.40	1.61	0.84	570_D	115.30	1.76	0.77
362_D	133.10	1.50	0.85	572_D	213.40	1.81	1.07
364_D	241.35	1.60	0.93	573_D	278.40	1.73	0.92
365_D	175.30	1.60	1.01	578_D	42.40	1.60	1.22
367_D	181.85	1.70	1.15	581_D	143.70	1.79	0.92
369_D	168.90	1.67	1.18	582_D	114.20	1.77	0.82
373_D	199.80	1.65	1.25	588_D	129.10	1.88	1.03
374_D	268.20	1.60	1.11	589_D	124.70	1.63	0.55
378_D	169.50	1.64	1.16	593_D	107.40	1.82	0.75
380_D	254.80	1.64	0.89	595_D	57.70	1.69	0.69
381_D	190.55	1.68	1.24	596_D	26.40	2.14	0.76
383_D	166.20	1.62	0.99	599_D	20.70	1.63	2.62
384_D	231.05	1.68	0.96	600_D	98.10	1.69	0.71
385_D	203.85	1.82	1.38	603_D	98.70	1.55	0.69
390_D	168.85	1.69	1.01	604_D	89.20	1.63	0.66

605_D	51.60	1.62	0.58	681_D	95.70	1.74	0.86
607_D	39.70	1.67	1.10	682_D	115.90	1.84	0.85
609_D	19.80	1.67	0.55	683_D	103.40	1.29	1.10
610_D	47.00	1.59	0.99	684_D	248.50	1.66	0.80
611_D	95.20	1.64	0.67	686_D	121.30	1.67	1.05
612_D	96.70	1.90	0.96	687_D	110.80	1.70	0.78
613_D	117.40	1.55	0.71	688_D	61.30	1.74	0.78
614_D	45.40	1.80	0.76	690_D	117.10	1.68	0.73
616_D	35.00	1.71	1.39	696_D	95.50	1.78	0.84
617_D	53.80	1.93	0.80	697_D	132.80	1.66	0.90
618_D	21.60	1.73	0.83	698_D	100.50	1.68	0.90
620_D	77.00	1.94	0.96	699_D	129.40	1.79	0.91
621_D	136.70	1.84	0.94	700_D	92.40	1.82	0.98
622_D	71.30	1.92	0.89	703_D	150.60	1.82	0.79
623_D	163.50	1.98	0.76	705_D	73.60	1.73	0.78
624_D	99.80	1.87	1.11	706_D	92.30	1.46	1.34
626_D	74.20	1.68	0.70	708_D	46.20	1.88	0.65
627_D	118.80	1.75	0.75	710_D	42.50	1.84	0.67
630_D	135.50	1.65	0.73	711_D	102.90	1.75	0.70
631_D	68.80	1.79	0.90	712_D	89.20	1.68	0.77
632_D	94.30	1.85	0.87	714_D	98.10	1.77	0.79
634_D	70.30	1.75	0.74	715_D	70.60	1.78	0.60
636_D	51.20	1.82	0.91	716_D	34.80	1.91	0.67
637_D	54.80	1.51	0.79	718_D	62.30	1.87	0.93
638_D	129.10	1.69	1.05	719_D	123.30	1.81	0.89
639_D	67.50	1.68	0.72	720_D	66.90	1.96	1.06
640_D	68.10	1.78	0.93	722_D	66.60	1.82	0.79
641_D	62.30	1.73	0.85	723_D	94.20	1.94	1.10
642_D	65.60	1.60	0.58	724_D	168.70	1.66	0.81
643_D	190.90	1.61	0.71	725_D	43.60	1.94	0.82
644_D	66.70	0.99	0.69	726_D	71.50	1.93	0.93
645_D	117.90	1.71	0.93	727_D	132.30	1.81	0.86
647_D	88.00	1.75	0.93	Promedio	115.26	1.76	0.94
648_D	49.00	1.72	0.93				
649_D	64.80	1.71	0.89				
650_D	102.20	1.75	0.94				
651_D	88.40	1.82	0.88				
652_D	44.90	1.80	0.61				
653_D	120.70	2.05	0.73				
654_D	54.10	1.90	0.82				
655_D	108.30	1.72	0.87				
658_D	61.90	1.88	0.91				
659_D	72.40	1.81	0.82				
660_D	99.60	1.83	0.80				
662_D	117.80	1.68	0.72				
665_D	78.40	1.82	0.82				
666_D	46.00	1.83	0.82				
667_D	48.50	1.75	0.75				
668_D	57.40	1.70	0.68				
669_D	86.50	2.29	0.63				
670_D	109.80	1.90	0.92				
671_D	62.70	1.88	0.89				
673_D	39.70	1.82	0.74				
675_D	61.80	1.86	0.85				
677_D	79.80	1.80	0.81				
679_D	85.50	1.78	0.69				

ANEXO 7: Resultados de diagnóstico de *Giardia lamblia*

CODIGO	PROVINCIA	DIAGNOSTICO MOLECULAR GIARDIASIS		DIAGNOSTICO GIARDIASIS POR MICROSCOPIA OPTICA
		ETANOL 70%	DICROMATO DE POTASIO 2.5%	
6	Pichincha	NO	NO	NO
7	Pichincha	SI	SI	SI
8	Pichincha	NO	NO	NO
11	Pichincha	NO	NO	NO
12	Pichincha	NO	NO	NO
13	Pichincha	NO	NO	NO
14	Pichincha	SI	SI	SI
17	Pichincha	NO	NO	NO
19	Pichincha	NO	NO	NO
20	Pichincha	NO	NO	NO
24	Pichincha	NO	NO	NO
25	Pichincha	NO	NO	NO
26	Pichincha	NO	NO	NO
27	Pichincha	NO	NO	NO
28	Pichincha	NO	NO	NO
29	Pichincha	NO	NO	NO
30	Pichincha	NO	NO	NO
31	Pichincha	NO	NO	NO
32	Pichincha	NO	NO	NO
33	Pichincha	NO	NO	NO
34	Pichincha	NO	SI	SI
35	Pichincha	NO	NO	NO
36	Pichincha	NO	NO	NO
37	Pichincha	NO	NO	NO
38	Pichincha	NO	NO	NO
42	Pichincha	NO	NO	NO
43	Pichincha	NO	NO	NO
44	Pichincha	NO	NO	NO
46	Pichincha	NO	NO	NO
47	Pichincha	SI	SI	NO
48	Pichincha	NO	SI	NO
49	Pichincha	NO	NO	NO
50	Pichincha	NO	NO	NO
53	Pichincha	NO	NO	NO
54	Pichincha	SI	SI	NO
57	Pichincha	NO	NO	NO
59	Pichincha	NO	NO	NO
60	Pichincha	NO	NO	NO
62	Pichincha	NO	NO	NO
63	Pichincha	NO	NO	NO
64	Loja	NO	NO	NO
65	Loja	NO	NO	NO

67	Loja	SI	SI	NO
68	Loja	SI	SI	NO
71	Loja	NO	NO	NO
73	Loja	NO	NO	NO
75	Loja	NO	NO	NO
77	Loja	NO	NO	NO
78	Loja	SI	SI	NO
79	Loja	NO	NO	NO
80	Loja	NO	NO	NO
82	Loja	NO	NO	NO
84	Loja	NO	NO	NO
85	Loja	NO	NO	NO
87	Loja	NO	NO	NO
88	Loja	NO	NO	NO
89	Loja	NO	NO	NO
90	Loja	SI	NO	NO
91	Loja	SI	SI	NO
92	Loja	NO	NO	NO
93	Loja	NO	NO	NO
95	Loja	SI	SI	NO
96	Loja	SI	NO	NO
97	Loja	NO	NO	NO
98	Loja	NO	NO	NO
99	Loja	SI	SI	NO
101	Loja	NO	NO	NO
104	Loja	NO	NO	NO
105	Loja	NO	NO	NO
106	Loja	NO	NO	NO
107	Loja	SI	NO	NO
108	Loja	NO	SI	NO
110	Loja	NO	NO	NO
113	Loja	NO	NO	NO
117	Guayas	NO	NO	NO
118	Guayas	NO	NO	NO
119	Guayas	SI	SI	SI
120	Guayas	NO	NO	NO
121	Guayas	NO	NO	NO
122	Guayas	NO	NO	NO
123	Guayas	NO	NO	NO
124	Guayas	NO	NO	NO
125	Guayas	SI	SI	NO
127	Guayas	NO	NO	NO
128	Guayas	NO	NO	NO
130	Guayas	NO	NO	NO
131	Guayas	NO	NO	NO
132	Guayas	SI	SI	NO
133	Guayas	NO	NO	NO
134	Guayas	NO	NO	NO

135	Guayas	NO	NO	NO
136	Guayas	NO	NO	NO
137	Guayas	NO	NO	NO
138	Guayas	NO	NO	NO
139	Guayas	NO	NO	NO
143	Guayas	SI	SI	NO
144	Guayas	NO	NO	NO
145	Guayas	NO	NO	NO
146	Guayas	NO	NO	NO
147	Guayas	NO	NO	NO
148	Guayas	NO	NO	NO
149	Guayas	SI	SI	SI
151	Guayas	NO	NO	NO
152	Guayas	NO	NO	NO
153	Guayas	NO	NO	NO
154	Guayas	SI	SI	NO
155	Guayas	NO	NO	NO
156	Guayas	NO	NO	NO
157	Guayas	NO	SI	NO
158	Guayas	SI	SI	SI
159	Guayas	NO	NO	NO
160	Guayas	NO	NO	NO
161	Guayas	NO	NO	NO
162	Guayas	NO	NO	SI
163	Guayas	SI	SI	NO
164	Guayas	NO	NO	NO
165	Guayas	NO	NO	NO
166	Guayas	NO	NO	NO
167	Guayas	NO	NO	NO
168	Guayas	NO	NO	NO
169	Guayas	NO	NO	NO
171	Guayas	NO	SI	NO
172	Guayas	NO	NO	NO
173	Guayas	NO	NO	NO
174	Guayas	SI	NO	NO
175	Guayas	NO	NO	NO
176	Guayas	NO	SI	NO
180	Guayas	NO	NO	NO
181	Guayas	SI	SI	NO
182	Guayas	NO	NO	NO
184	Guayas	SI	NO	NO
187	Guayas	NO	NO	NO
188	Guayas	SI	NO	SI
190	Guayas	SI	NO	NO
191	Guayas	NO	NO	NO
192	Guayas	NO	NO	NO
193	Guayas	NO	SI	SI
195	Guayas	NO	NO	SI

196	Guayas	NO	SI	SI
198	Guayas	SI	SI	SI
199	Guayas	NO	NO	NO
200	Guayas	NO	NO	NO
201	Guayas	NO	NO	NO
202	Guayas	SI	NO	NO
204	Guayas	NO	NO	NO
206	Guayas	NO	NO	NO
207	Guayas	NO	NO	NO
210	Guayas	NO	NO	NO
211	Guayas	NO	NO	NO
215	Los Ríos	NO	NO	NO
216	Los Ríos	SI	SI	SI
217	Los Ríos	SI	NO	NO
218	Los Ríos	NO	SI	NO
220	Los Ríos	NO	SI	SI
221	Los Ríos	NO	NO	NO
222	Los Ríos	NO	NO	NO
223	Los Ríos	NO	NO	NO
224	Los Ríos	NO	SI	NO
226	Los Ríos	NO	NO	NO
227	Los Ríos	NO	NO	NO
228	Los Ríos	NO	NO	NO
229	Los Ríos	NO	NO	NO
230	Los Ríos	NO	NO	NO
231	Los Ríos	NO	NO	NO
232	Los Ríos	NO	NO	NO
234	Los Ríos	NO	NO	NO
235	Los Ríos	NO	NO	NO
237	Los Ríos	NO	NO	NO
239	Los Ríos	NO	SI	SI
240	Los Ríos	NO	NO	NO
242	Los Ríos	NO	NO	NO
243	Los Ríos	SI	NO	NO
244	Los Ríos	NO	NO	NO
245	Los Ríos	NO	NO	NO
246	Los Ríos	NO	NO	NO
247	Los Ríos	NO	NO	NO
248	Los Ríos	NO	NO	NO
249	Los Ríos	NO	NO	NO
250	Los Ríos	NO	NO	NO
251	Los Ríos	NO	SI	SI
252	Los Ríos	NO	NO	NO
253	Los Ríos	NO	NO	NO
255	Los Ríos	NO	NO	NO
256	Los Ríos	NO	NO	NO
257	Los Ríos	NO	NO	NO
258	Los Ríos	NO	NO	NO

259	Los Ríos	NO	NO	NO
260	Los Ríos	NO	NO	NO
261	Los Ríos	NO	NO	NO
262	Los Ríos	NO	NO	NO
265	Los Ríos	NO	NO	NO
266	Los Ríos	NO	NO	NO
267	Los Ríos	NO	NO	NO
268	Los Ríos	NO	SI	SI
269	Los Ríos	NO	NO	NO
271	Los Ríos	NO	NO	NO
272	Los Ríos	NO	SI	SI
273	Los Ríos	NO	NO	NO
274	Los Ríos	NO	NO	NO
275	Los Ríos	NO	NO	NO
279	Los Ríos	NO	NO	NO
281	Los Ríos	NO	NO	NO
282	Los Ríos	NO	NO	NO
283	Los Ríos	NO	NO	NO
284	Los Ríos	NO	NO	NO
285	Los Ríos	NO	NO	NO
286	Los Ríos	NO	NO	NO
287	Los Ríos	NO	NO	NO
288	Los Ríos	NO	NO	NO
289	Los Ríos	NO	NO	NO
290	Los Ríos	NO	NO	NO
291	Los Ríos	NO	NO	NO
292	Los Ríos	SI	NO	NO
297	Los Ríos	NO	NO	NO
300	Los Ríos	NO	NO	NO
303	Los Ríos	NO	NO	NO
304	Los Ríos	NO	NO	NO
305	Los Ríos	NO	NO	NO
306	Los Ríos	NO	NO	NO
307	Los Ríos	NO	NO	NO
308	Los Ríos	NO	NO	NO
309	Los Ríos	NO	NO	NO
312	Los Ríos	NO	NO	NO
316	Los Ríos	NO	NO	NO
317	Los Ríos	NO	NO	SI
318	Los Ríos	NO	NO	NO
319	Los Ríos	NO	NO	NO
320	Los Ríos	NO	NO	NO
321	Los Ríos	NO	NO	SI
322	Los Ríos	NO	NO	NO
323	Los Ríos	NO	NO	NO
324	Los Ríos	NO	NO	NO
326	Los Ríos	SI	SI	NO
328	Los Ríos	NO	NO	NO

329	Los Ríos	NO	NO	NO
330	Los Ríos	SI	NO	NO
333	Los Ríos	NO	NO	NO
334	Los Ríos	NO	NO	NO
335	Los Ríos	NO	NO	NO
337	Los Ríos	NO	NO	NO
339	Los Ríos	NO	NO	NO
340	Los Ríos	NO	NO	NO
341	Los Ríos	NO	NO	NO
343	Los Ríos	NO	NO	NO
345	Los Ríos	NO	NO	NO
346	Los Ríos	NO	NO	NO
348	Los Ríos	NO	NO	NO
350	Los Ríos	NO	NO	NO
353	Los Ríos	NO	NO	NO
355	Los Ríos	NO	NO	NO
356	Los Ríos	NO	NO	NO
357	Los Ríos	NO	NO	NO
358	Los Ríos	SI	NO	NO
359	Los Ríos	NO	NO	NO
360	Los Ríos	NO	NO	NO
361	Los Ríos	NO	NO	NO
362	Los Ríos	NO	NO	NO
364	Los Ríos	NO	NO	NO
365	Los Ríos	NO	NO	NO
367	Los Ríos	NO	NO	NO
369	Los Ríos	NO	NO	NO
373	Los Ríos	NO	NO	NO
374	Los Ríos	NO	NO	NO
378	Los Ríos	NO	NO	NO
380	Los Ríos	NO	NO	NO
381	Los Ríos	NO	NO	NO
383	Los Ríos	NO	NO	NO
384	Los Ríos	NO	NO	NO
385	Los Ríos	NO	NO	NO
390	Los Ríos	NO	NO	NO
392	Los Ríos	NO	NO	NO
394	Los Ríos	NO	NO	NO
395	Los Ríos	NO	NO	NO
398	Los Ríos	NO	NO	NO
399	Los Ríos	NO	NO	NO
400	Los Ríos	NO	NO	NO
401	Los Ríos	NO	NO	NO
402	Los Ríos	NO	NO	NO
407	Los Ríos	NO	NO	NO
411	Los Ríos	NO	NO	NO
412	Los Ríos	NO	NO	NO
413	Los Ríos	NO	NO	NO

414	Los Ríos	NO	NO	NO
415	Los Ríos	NO	NO	NO
417	Los Ríos	SI	SI	NO
420	Los Ríos	NO	NO	NO
422	Los Ríos	NO	NO	NO
424	Los Ríos	NO	NO	NO
425	Los Ríos	NO	NO	NO
426	Los Ríos	NO	NO	NO
542	Guayas	NO	NO	NO
544	Guayas	NO	NO	NO
545	Guayas	NO	NO	NO
546	Guayas	NO	NO	NO
547	Guayas	NO	NO	NO
548	Guayas	NO	NO	NO
550	Guayas	NO	NO	NO
551	Guayas	NO	NO	NO
554	Guayas	NO	NO	NO
555	Guayas	NO	NO	NO
556	Guayas	NO	NO	NO
557	Guayas	NO	NO	NO
558	Guayas	NO	NO	NO
559	Guayas	NO	NO	NO
560	Guayas	SI	SI	NO
561	Guayas	NO	NO	NO
562	Guayas	NO	NO	NO
566	Guayas	NO	SI	SI
567	Guayas	NO	NO	NO
568	Guayas	NO	NO	NO
569	Guayas	NO	NO	NO
570	Guayas	NO	NO	NO
572	Guayas	NO	NO	NO
573	Guayas	NO	NO	NO
578	Guayas	NO	NO	NO
581	Guayas	SI	SI	NO
582	Guayas	NO	NO	NO
588	Guayas	NO	NO	NO
589	Guayas	NO	NO	NO
593	Guayas	NO	NO	NO
595	Guayas	NO	NO	NO
596	Guayas	NO	NO	NO
599	Guayas	NO	NO	NO
600	Guayas	NO	NO	NO
603	Guayas	NO	NO	NO
604	Guayas	NO	NO	NO
605	Guayas	NO	SI	NO
607	Guayas	NO	NO	NO
609	Guayas	NO	NO	NO
610	Guayas	NO	NO	SI

611	Guayas	NO	NO	NO
612	Guayas	NO	NO	NO
613	Guayas	NO	NO	NO
614	Guayas	NO	NO	NO
616	Guayas	NO	NO	NO
617	Guayas	NO	NO	NO
618	Guayas	NO	NO	NO
620	Guayas	NO	NO	NO
621	Guayas	NO	NO	NO
622	Guayas	NO	NO	NO
623	Guayas	NO	NO	NO
624	Guayas	NO	NO	NO
626	Guayas	NO	NO	NO
627	Guayas	NO	NO	NO
630	Guayas	NO	NO	NO
631	Guayas	NO	NO	NO
632	Guayas	NO	NO	NO
634	Guayas	NO	NO	NO
636	Guayas	NO	NO	NO
637	Guayas	NO	NO	NO
638	Guayas	NO	NO	NO
639	Guayas	NO	NO	NO
640	Guayas	NO	NO	NO
641	Guayas	NO	NO	NO
642	Guayas	NO	NO	NO
643	Guayas	NO	NO	NO
644	Guayas	NO	NO	NO
645	Guayas	NO	NO	NO
647	Guayas	NO	SI	NO
648	Guayas	NO	NO	NO
649	Guayas	NO	NO	NO
650	Guayas	NO	NO	NO
651	Guayas	NO	NO	NO
652	Guayas	SI	SI	SI
653	Guayas	NO	NO	SI
654	Guayas	NO	NO	NO
655	Guayas	NO	NO	NO
658	Guayas	NO	NO	NO
659	Guayas	NO	NO	NO
660	Guayas	NO	NO	NO
662	Guayas	NO	NO	NO
665	Guayas	NO	NO	NO
666	Guayas	SI	SI	SI
667	Guayas	NO	SI	NO
668	Guayas	NO	NO	NO
669	Guayas	NO	NO	NO
670	Guayas	NO	NO	NO
671	Guayas	SI	SI	SI

673	Guayas	NO	NO	NO
675	Guayas	NO	NO	NO
677	Guayas	NO	NO	NO
679	Guayas	NO	NO	NO
681	Guayas	NO	NO	NO
682	Guayas	NO	NO	NO
683	Guayas	NO	NO	NO
684	Guayas	NO	NO	NO
686	Guayas	NO	NO	NO
687	Guayas	NO	NO	NO
688	Guayas	NO	NO	NO
690	Guayas	NO	NO	NO
696	Guayas	NO	NO	NO
697	Guayas	NO	NO	NO
698	Guayas	NO	NO	NO
699	Guayas	NO	NO	NO
700	Guayas	SI	NO	SI
703	Guayas	NO	NO	NO
705	Guayas	NO	NO	NO
706	Guayas	NO	NO	NO
708	Guayas	NO	NO	NO
710	Guayas	NO	NO	NO
711	Guayas	NO	NO	NO
712	Guayas	SI	NO	SI
714	Guayas	NO	NO	NO
715	Guayas	NO	NO	NO
716	Guayas	NO	SI	SI
718	Guayas	NO	NO	NO
719	Guayas	NO	NO	NO
720	Guayas	NO	NO	NO
722	Guayas	NO	NO	NO
723	Guayas	NO	NO	NO
724	Guayas	NO	NO	NO
725	Guayas	NO	NO	NO
726	Guayas	NO	SI	NO
727	Guayas	NO	NO	NO
Total Positivas		43	49	29

ANEXO 8: Resultados encuesta factores socioeconómicos y de riesgo

COD IGO	Nivel Instrucción Jefe Hogar	Material Paredes Vivienda	Material Piso Vivienda	Procedencia Agua	Tipo de Vivienda	Lav Man coc	Lav Ma n c	Lav Man Ban	No Lav	Per ro	Gat o	Cu y	Av es	Anim Corra
6	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Mediagua	Yes	No	No	No	No	No	No	No	Yes
7	Secundaria incompleta	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
8	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Sin respuesta	Potable	Mediagua	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
11	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
12	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
13	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
14	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Mediagua	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
19	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
20	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
24	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No
25	Primaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
26	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
27	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
28	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
29	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No
30	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
31	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
32	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	Primaria incompleta	Adobe/ Tapia	Tabla sin tratar	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
34	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
35	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No

36	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
37	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
38	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
42	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
43	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
44	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes
46	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
47	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No								
48	Primaria incompleta	Adobe/ Tapia	Tabla sin tratar	Potable	Mediagua	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No
49	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No								
50	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No
53	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
54	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
57	Secundaria completa	Adobe/ Tapia	Tabla sin tratar	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
59	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
60	Primaria incompleta	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
62	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
63	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No
64	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes
65	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
67	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
68	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No
71	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes
73	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
75	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
77	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No

78	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
79	Primaria incompleta	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
80	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
82	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	No
84	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
85	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
87	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
88	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
89	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
90	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
91	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
92	Hasta 3 años de educación superior	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
93	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No
95	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
96	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
97	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	No
98	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
99	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
101	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
104	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
105	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes
106	Hasta 3 años de educación superior	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
107	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	No	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
108	Sin estudios	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
110	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
113	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No

117	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
118	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
119	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
120	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
121	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Pozo	Casa/villa	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
122	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
123	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
124	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
125	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
127	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
128	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
130	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
131	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
132	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
133	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
134	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
135	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
136	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
137	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
138	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
139	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
143	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes
144	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
145	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No
146	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Pozo	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No

147	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
148	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
149	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No
151	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
152	Primaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
153	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
154	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
155	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
156	Hasta 3 años de educación superior	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Pozo	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
157	Secundaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Pozo	Sin respuesta	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
158	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
159	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
160	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
161	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
162	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
163	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
164	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Potable	Choza/Covacha/Otro	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No
165	Secundaria incompleta	Sin respuesta	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
166	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No
167	Primaria completa	Adobe/ Tapia	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
168	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
169	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
171	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
172	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
173	Secundaria completa	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
174	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No

175	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
176	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
180	Hasta 3 años de educación superior	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
181	Hasta 3 años de educación superior	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
182	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
184	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
187	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
188	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
190	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
191	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
192	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No
193	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
195	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No
196	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
198	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	No
199	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
200	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No
201	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
202	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Sin respuesta	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
204	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
206	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Sin respuesta	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
207	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
210	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
211	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
215	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes

216	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
217	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
218	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
220	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
221	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
222	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
223	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
224	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
226	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
227	Secundaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
228	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
229	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
230	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
231	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
232	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
234	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
235	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
237	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
239	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
240	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
242	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
243	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
244	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
245	Sin respuesta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
246	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
247	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No

248	Postgrado	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No
249	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No
250	Secundaria incompleta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
251	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
252	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No
253	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
255	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No
256	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
257	Sin estudios	Sin respuesta	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No
258	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
259	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
260	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
261	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
262	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No
265	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No
266	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
267	Primaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No
268	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
269	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No
271	Sin estudios	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Pozo	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
272	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Hormigón	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
273	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Sin respuesta	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
274	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
275	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Sin respuesta	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
279	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No

281	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
282	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
283	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
284	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
285	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
286	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
287	Secundaria completa	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
288	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
289	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
290	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
291	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
292	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
297	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
300	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
303	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
304	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
305	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
306	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
307	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
308	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
309	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
312	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
316	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
317	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Pozo	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
318	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Rancho	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No

319	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
320	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
321	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Pozo	Choza/Covacha/Otro	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
322	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
323	Primaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Tabla sin tratar	Pozo	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
324	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
326	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
328	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
329	Sin estudios	Caña no revestida/ Otros materiales	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Pozo	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
330	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
333	Primaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Pozo	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
334	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes
335	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
337	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
339	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
340	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
341	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
343	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
345	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	Yes
346	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
348	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
350	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
353	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
355	Hasta 3 años de educación superior	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No

356	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
357	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
358	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
359	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
360	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
361	Secundaria incompleta	Adobe/ Tapia	Sin respuesta	Potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
362	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
364	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
365	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Rancho	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
367	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes
369	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
373	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
374	Secundaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
378	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
380	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
381	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Rancho	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
383	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
384	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
385	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
390	Secundaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes
392	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes
394	Secundaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
395	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
398	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
399	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes
400	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No

401	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
402	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
407	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
411	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
412	Sin estudios	Caña no revestida/ Otros materiales	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes
413	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
414	Sin estudios	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
415	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
417	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
420	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
422	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Entubada no potable	Mediagua	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No
424	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
425	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
426	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
542	Primaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
544	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
545	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
546	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No
547	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
548	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
550	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No
551	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
554	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
555	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
556	Secundaria incompleta	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No
557	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No

558	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	Sin respuesta	No	No	No	No	No	No	No	No	No
559	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Duela, parquet, tablón o piso flotante	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
560	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
561	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No
562	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
566	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
567	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
568	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
569	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
570	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
572	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
573	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
578	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Mediagua	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
581	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
582	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
588	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
589	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
593	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Ladrillo o cemento	Pozo	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
595	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Sin respuesta	Pozo	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
596	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
599	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
600	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
603	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
604	4 o más años de educación superior (sin postgrado)	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
605	Secundaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No

607	Primaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
609	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
610	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
611	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Agua de ríos, vertientes, acequias	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
612	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
613	Secundaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
614	Sin respuesta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
616	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
617	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
618	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
620	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
621	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
622	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
623	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
624	Sin estudios	Caña revestida o bahareque/ Madera	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Mediagua	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No
626	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
627	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
630	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
631	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
632	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
634	Secundaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
636	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
637	Primaria completa	Hormigón	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
638	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
639	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No

640	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
641	Primaria completa	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
642	Secundaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Ladrillo o cemento	Pozo	Rancho	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
643	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
644	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
645	Secundaria incompleta	Caña no revestida/ Otros materiales	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Agua de ríos, vertientes, acequias	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
647	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
648	Sin estudios	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Pozo	Mediagua	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
649	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
650	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
651	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
652	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
653	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Pozo	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
654	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
655	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
658	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No	No
659	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
660	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
662	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
665	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
666	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No
667	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
668	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
669	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
670	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No
671	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Sin respuesta	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No

673	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
675	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Sin respuesta	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
677	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
679	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
681	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
682	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Tierra/ Caña/ Otros materiales	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
683	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No
684	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
686	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
687	Hasta 3 años de educación superior	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
688	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
690	Primaria completa	Caña revestida o bahareque/ Madera	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
696	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No
697	Secundaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
698	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
699	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
700	Sin estudios	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Entubada no potable	Casa/villa	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
703	Primaria completa	Hormigón	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No
705	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Mediagua	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No
706	Primaria incompleta	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Entubada no potable	Casa/villa	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
708	Primaria completa	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
710	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Ladrillo o cemento	Potable	Departamento en casa o edificio	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
711	Sin estudios	Caña revestida o bahareque/ Madera	Tabla sin tratar	Potable	Choza/Covacha/Otro	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
712	Primaria incompleta	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Casa/villa	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No
714	Secundaria completa	Ladrillo o bloque	Cerámica, baldosa, vinil o mármol	Potable	Cuarto(s) en casa de inquilinato	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No

ANEXO 9: Resultados Índice de Masa Corporal

Codigo	Peso (Kg)	Talla (cm)	Indice Masa Corporal
6	35.38	140	18.05
7	29.21	127	18.11
8	28.8	125	18.43
11	30.48	135	16.73
12	30.48	142.5	15.01
13	24.4	123.5	16.00
14	38.46	138	20.20
17	37.29	136	20.16
19	30.3	134	16.87
20	39.01	144	18.81
24	31.6	135	17.34
25	30.66	133	17.33
26	51	147	23.60
27	38.01	138	19.96
28	46.67	149	21.02
29	46.72	157	18.95
30	41.19	148	18.80
31	24.86	126	15.66
32	32.3	138	16.96
33	29.12	137	15.52
34	53.07	161	20.47
35	43	140	18.80
36	41.55	139	21.50
37	34.75	154	14.65
38	32.57	147.2	15.03
42	29.94	133	16.92
43	28.89	129	17.36
44	29.9	130	17.40
46	31.2	131	17.50
47	33.2	131	17.77
48	31.12	133	17.59
49	32.57	137	17.35
50	32	131	18.65
53	31.2	131	18.50
54	34.2	121	19.40
57	35.11	122	23.59
59	34.2	113	26.78
60	29.39	111	23.86
62	34.65	131	20.19
63	33.48	115	25.31
64	38.83	146	18.22
65	16.06	99.5	16.22
67	34.38	137.5	18.19

68	18.23	114.5	13.91
71	31.03	137	16.53
73	42.27	143	20.67
75	16.69	108.5	14.18
77	23.13	130	13.69
78	27.76	135	15.23
79	17.96	110	14.84
80	31.57	142	15.66
82	24.68	128	15.06
84	29.21	124	19.00
85	28.39	132	16.30
87	27.67	126.5	17.29
88	29.03	139	15.03
89	25.13	132	14.42
90	38.1	148	17.39
91	33.7	130	19.94
92	37.1	141	18.66
93	52.4	146	24.58
95	39	148	17.80
96	24.9	131	14.51
97	33.8	146.5	15.75
98	40.2	140	20.51
99	33	143	16.14
101	37.3	149	16.80
104	27.4	133	15.49
105	30.4	145	14.46
106	34.5	139	17.86
107	29.03	138	15.24
108	26.67	139.5	13.71
110	23.41	123	15.47
113	39	149	17.57
117	43.5	138	22.84
118	37.2	140	18.98
119	29.5	138	15.49
120	47.5	143	23.23
121	36.5	142	18.10
122	49.8	145	23.69
123	44.2	143	21.61
124	63.4	139	32.81
125	45.1	142	22.37
127	31.03	133	17.54
128	43.6	135	23.92
130	30.7	134	17.10
131	33.5	141	16.85
132	33.6	136	18.17
133	25.3	135	13.88
134	41.9	153	17.90
135	35	147	16.20

136	24	126	15.12
137	44.4	145	21.12
138	26	124	16.91
139	34.3	133	19.39
143	33.4	141	16.80
144	41	142	20.33
145	29.9	140	15.26
146	28.4	129	17.07
147	31.9	133	18.03
148	41.3	142	20.48
149	29.7	132	17.05
151	32.9	137	17.53
152	42.9	151	18.81
153	28.8	140	14.69
154	37.6	128	22.95
155	31.6	136	17.08
156	36.3	144	17.51
157	44.5	136	24.06
158	27.8	141	13.98
159	29.9	140	15.26
160	48.3	135	26.50
161	27.4	135	15.03
162	37.2	147	17.22
163	28.4	136	15.35
164	33.2	145	15.79
165	35.7	127	22.13
166	51.7	149	23.29
167	26.7	138	14.02
168	35.4	152	15.32
169	44.9	139	23.24
171	45.7	153	19.52
172	26.4	128	16.11
173	34.4	137	18.33
174	34.2	135	18.77
175	31.6	125	20.22
176	38.5	151	16.89
180	31.3	141	15.74
181	31.2	140	18.30
182	52.6	153	22.47
184	43.5	132	24.97
187	29	137	15.45
188	32	136	17.30
190	36	132	20.66
191	36.5	150	16.22
192	28.4	133	16.06
193	32.8	145	15.60
195	41.2	144	19.87
196	28	125	17.92

198	34.5	147	15.97
199	39.7	145	18.88
200	33.6	140	17.14
201	36.3	141	18.26
202	34	146	15.95
204	30.2	139	15.63
206	28.6	132	16.41
207	35	144	16.88
210	45.8	147	21.19
211	44	156	18.08
215	28.4	127	17.61
216	42.6	139	22.05
217	41.7	141	20.97
218	38.3	133	21.65
220	52	143	25.43
221	25.2	128	15.38
222	32.4	141	16.30
223	26.6	126	16.75
224	33.3	142	16.51
226	31.5	138	16.54
227	45.9	145	21.83
228	49.1	147	22.72
229	37.9	150	16.84
230	51.5	148	23.51
231	49	148	22.37
232	35.2	141	17.71
234	33.1	152	14.33
235	41.2	144	19.87
237	26.9	129	16.16
239	35.1	137	18.70
240	32.5	140	16.58
242	33.6	133	18.99
243	44.8	147	20.73
244	56.8	154	23.95
245	34	139	17.60
246	28.6	141	14.39
247	39.9	145	18.98
248	51.5	141	25.90
249	38.5	148	17.58
250	32.2	142	15.97
251	45.3	145	21.55
252	33.9	145	16.12
253	53.3	142	26.43
255	40.3	154	16.99
256	68	155	28.30
257	61.2	136	33.09
258	36.6	133	20.69
259	50	141	25.15

260	48.6	146	22.80
261	32.7	141	16.45
262	44.7	141	22.48
265	37.8	150	16.80
266	32.4	136	17.52
267	70.9	160	27.70
268	31.9	133	18.03
269	41.2	143	20.15
271	36.1	144	17.41
272	44	137	23.44
273	28.3	130	16.75
274	50.4	144	24.31
275	52.5	141	26.41
279	28.4	142	14.08
281	26.4	131	15.38
282	28.4	130	16.80
283	33.5	134	18.66
284	40.1	148	18.31
285	27.8	129	16.71
286	30.5	138	16.02
287	34.6	131	20.16
288	26.7	130	15.80
289	45.4	151	19.91
290	32.5	140	16.58
291	31.4	136	16.98
292	56.5	144	27.25
297	50.9	156	20.92
300	36.1	144	17.41
303	59.5	142	29.51
304	40.3	128	24.60
305	36.6	131	21.33
306	32.1	141	16.15
307	49.4	123	32.65
308	35.4	141	17.81
309	53	147	24.53
312	32.3	135	17.72
316	38.18	140	19.48
317	26.81	127	16.62
318	22.06	142	10.94
319	19.62	139	10.15
320	28.64	139	14.82
321	43	142	21.33
322	28.27	128	17.25
323	26.18	131	15.26
324	52.9	157	21.46
326	27	133	15.26
328	51.3	154	21.63
329	29.8	141	14.99

330	40.4	152	17.49
333	31.8	141	16.00
334	22.4	123	14.81
335	29.2	143	14.28
337	29.2	140	14.90
339	45.7	150	20.31
340	32.6	141	16.40
341	25.4	127	15.75
343	54.5	144	26.28
345	31.6	144	15.24
346	27.4	135	15.03
348	33.7	141	16.95
350	37.8	153	16.15
353	37.4	136	20.22
355	33.7	137	17.96
356	37.6	138	19.74
357	27	130	15.98
358	36.8	146	17.26
359	24.3	127	15.07
360	31.7	137	16.89
361	45	149	20.27
362	33.4	150	14.84
364	31.8	138	16.70
365	22	126	13.86
367	36.2	136	19.57
369	33.5	140	17.09
373	35.9	145	17.07
374	28.6	129	17.19
378	30.1	141	15.14
380	39	147	18.05
381	33	142	16.37
383	26.3	133	14.87
384	26.8	136	14.49
385	31.8	140	16.22
390	56.9	155	23.68
392	36	144	17.36
394	34.3	136	18.54
395	33.9	145	16.12
398	29.8	144	14.37
399	41	141	20.62
400	35.6	137	18.97
401	30.4	132	17.45
402	46.6	168	16.51
407	33.1	145	15.74
411	31	147	14.35
412	38.3	154	16.15
413	31.6	139	16.36
414	34.4	148	15.70

415	57.9	150	25.73
417	31	131	18.06
420	23.1	132	13.26
422	60.3	152	26.10
424	31.6	136	17.08
425	26	138	13.65
426	24	134	13.37
542	56.5	146	26.51
544	56.8	132	32.60
545	34.3	150	15.24
546	35.8	140	18.27
547	57.6	152	24.93
548	34	133	19.22
550	42.2	140	21.53
551	37.5	137	19.98
554	51.9	155.5	21.46
555	44	160	17.19
556	44.4	153	18.97
557	45.1	155.5	18.65
558	43.3	156.8	17.61
559	72.9	177	23.27
560	36.1	147.5	16.59
561	37.9	146.5	17.66
562	47.7	161	18.40
566	28.2	119	19.91
567	35.7	145	16.98
568	53	122	35.61
569	29.6	135	16.24
570	50.5	131	29.43
572	34.8	134	19.38
573	36.6	144	17.65
578	41.4	141.1	20.79
581	44.6	139	23.08
582	36	138.1	18.88
588	59.1	153	25.25
589	28.9	131	16.84
593	29.8	140	15.20
595	43.6	153	18.63
596	35.9	135	19.70
599	34.1	137	18.17
600	49.2	146.5	22.92
603	35.4	135	19.42
604	39.4	144	19.00
605	42.3	150	18.80
607	45.8	145	21.78
609	54.4	154	22.94
610	38.4	145	18.26
611	39.8	146	18.67

612	63.8	161	24.61
613	37.6	138.5	19.60
614	47.9	145	22.78
616	40.1	149	18.06
617	39.5	141	19.87
618	35.9	136	19.41
620	37.2	150	16.53
621	38	140	19.39
622	34.5	142	17.11
623	25.1	131	14.63
624	28.3	137	15.08
626	42.8	159	16.93
627	40.3	150	17.91
630	37.1	147	17.17
631	39.3	144	18.95
632	45.7	145	21.74
634	56.7	157	23.00
636	48.4	145	23.02
637	39.5	147	18.28
638	40.9	141	20.57
639	35.6	138	18.69
640	34.2	146	16.04
641	26.8	134	14.93
642	30.6	135	16.79
643	44.4	141	22.33
644	32.4	143	15.84
645	36.3	146	17.03
647	42.3	144	20.40
648	38.2	141	19.21
649	39.7	142	19.69
650	35.9	134	19.99
651	41.1	153	17.56
652	47.7	139	24.69
653	37.1	136	20.06
654	31.9	132	18.31
655	33.1	137	17.64
658	40.4	136.5	21.68
659	29.6	128	18.07
660	27.5	130.1	16.25
662	28.8	140	14.69
665	39.1	146	18.34
666	38.4	138.2	20.11
667	41.3	136	22.33
668	27.5	139	14.23
669	52.4	152	22.68
670	32.8	36.6	24.88
671	61.5	150.2	27.26
673	26	120.2	18.00

675	54.7	144.5	26.20
677	29.2	132	16.76
679	30.7	139	15.89
681	39	133	22.05
682	43.5	151	19.08
683	42.9	147	19.85
684	30.4	120	21.11
686	43.1	155	17.94
687	44.5	145	21.17
688	44.9	153	19.18
690	32	134	17.82
696	68.6	161	26.47
697	48.1	143	23.52
698	62.8	139	32.50
699	44.2	152	19.13
700	44.6	139	23.08
703	69.4	150	30.84
705	39.6	149	17.84
706	44.8	156	18.41
708	53.7	152	23.24
710	30.1	135	16.52
711	34.2	138	17.96
712	30.2	136	16.33
714	33.5	139	17.34
715	30.8	133	17.41
716	38.7	147	17.91
718	45.5	148	20.77
719	34.93	150	15.52
720	32.21	160	12.58
722	30.6	145	14.55
723	44.3	137	23.60
724	39.1	114	30.09
725	41.9	149	18.87
726	53.8	148	24.56
727	45.6	158	18.27