

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Postgrados

Investigación de *Entamoeba histolytica* en dos Comunidades Ecuatorianas

Thamara Andrade Mayorga

Sonia Zapata, Ph.D., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Magister en Microbiología

Quito, junio de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Postgrados

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Investigación de *Entamoeba histolytica* en dos Comunidades Ecuatorianas

Thamara Grisela Andrade Mayorga

Sonia Zapata, Ph.D.,

Director de Tesis

Gabriel Trueba, Ph.D.,

Director de la Maestría en Microbiología y

Miembro del Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.,

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.,

Decano del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Victor Viteri Breedy, Ph.D.,

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, junio de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Thamara Andrade Mayorga

C. I.: 1705826269

Lugar: Quito, junio de 2015

DEDICATORIA

A mi familia.

A la comunidad ecuatoriana.

Resumen

Introducción: La amebiasis constituye la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias (después de malaria y esquistosomiasis) a nivel mundial. La mayor morbilidad y mortalidad se han reportado en regiones de Centroamérica, Sudamérica, África, y el Subcontinente Indio. Sin embargo, la prevalencia de la amebiasis podría estar sobreestimada debido a que la microscopía no permite diferenciar *E. histolytica* (patógena) de *E. dispar* (no patógena). El uso de métodos moleculares contribuye a establecer la prevalencia real de esta parasitosis.

Métodos: Se realizó un estudio de casos-controles en una comunidad rural y en una urbana y se analizó 346 muestras de heces utilizando microscopía simple y amplificación del gen *SREHP* para identificar y diferenciar *E. histolytica* (553 pb) y *E. dispar* (567 pb).

Resultados: Por microscopía la frecuencia de quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar* fue del 2.6% en la población urbana y 14.4% en la población rural. Por PCR la positividad fue de 29% en la población urbana y 17.8% en la población rural. En la población urbana la frecuencia de *E. histolytica* fue del 13%, mientras que la de *E. dispar* fue del 16% y 3.5% de las muestras presentó co-infección. En la población rural la frecuencia de *E. histolytica* fue de 3.4%, de *E. dispar* 14.4% y no se encontró co-infección. *E. histolytica* no estuvo asociada con diarrea en ninguna de las dos comunidades (OR 2.07, IC 95% 0.87-4.89 en la población urbana y OR 4.37, IC 95% 0.70-7.24 en la población rural).

Conclusiones: En concordancia con otros estudios en el Ecuador y países con características socioeconómicas similares, la frecuencia de *E. histolytica* es menor que la de *E. dispar* en las dos poblaciones estudiadas. En ambas poblaciones *E. histolytica* parecería no estar asociada a enfermedad diarreica. La técnica por PCR podría ser una prueba más sensible y más específica para el diagnóstico de amebiasis.

Palabras clave: Amebiasis, Colitis y enfermedad extraintestinal, Epidemiología.

Abstract

Introduction: Amebiasis is the third leading cause of death from parasitic disease after malaria and schistosomiasis; most morbidity and mortality have been reported in regions of Central and South America, Africa and the Indian subcontinent. However, the prevalence of amebiasis may be overestimated because most reports rely on microscopy which does not differentiate between the pathogenic *E. histolytica* and the commensal *E. dispar*. New diagnostic techniques allow the differentiation and contribute to establish the prevalence of this parasite.

Method: A case-control study was conducted in both rural and urban communities and 346 stool samples were analyzed using microscopic techniques and PCR (gene *SREHP*) in stool samples to identify and differentiate *E. histolytica* (553 bp) from *E. dispar* (567 bp).

Results: Frequency of *E. histolytica* / *E. dispar* cysts detected by microscopy was 2.6% for the urban population and 14.4% for the rural population. When analyzed by PCR the frequency was 29% in the urban population and 17.8% of the rural population was positive for any species. In the urban population frequency of *E. histolytica* was 13% whereas that of *E. dispar* was 16% (3.5% of the samples had coinfection). In the rural population frequency of *E. histolytica* was 3.4% and *E. dispar* was 14.4% and there was not evidence of co-infection. *E. histolytica* infection was not associated with diarrhea in any of the two communities OR 2.07, CI 95% 0.87-4.89 in the urban population and OR 4.37, CI 95% 0.70-7.24 in the rural population.

Conclusions: Consistent with similar studies in Ecuador and countries with comparable socio- economic characteristics, *E. histolytica*'s frequency is lower than that of *E. dispar* in both populations (urban and rural). *E. histolytica* was not associated with diarrheal disease. The PCR technique may be a more sensitive and specific diagnostic methodology in fecal testing for amebiasis.

Keywords: Amebiasis, colitis and extraintestinal disease, Epidemiology,

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	11
Amebiasis, concepto y epidemiología.....	11
<i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> : dos especies morfológicamente idénticas.....	12
Métodos diagnósticos y el impacto de su aplicación en el estudio de la epidemiología de la amebiasis.....	13
<i>E. histolytica</i> : fisiología, estructura y patogenia.....	15
Adhesión.....	16
Lisis tisular.....	17
Factores de virulencia.....	18
La respuesta inmune.....	19
Factores que influyen en el desarrollo de la amebiasis invasiva.....	20
La amebiasis en Ecuador.....	21
Referencias.....	22

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	27
Introducción.....	28
Materiales y métodos.....	29
Área de estudio y colección de muestras.....	29
Transporte y conservación de las muestras.....	30
Identificación de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	31
Análisis estadístico.....	32
Resultados.....	32
Discusión.....	33
Conclusiones y recomendaciones.....	35
Referencias.....	41

TABLAS

Tabla 1: Resumen de investigaciones de Entamoeba histolytica/dispar en varias regiones del mundo.....	36
Tabla 2: Datos de área de estudio y muestreo.....	37
Tabla 3: Mezcla de reacción para PCR.....	37
Tabla 4: <i>E.histolytica/E.dispar</i> por PCR y microscopía: sensibilidad y especificidad del método microscópico con relación al PCR.....	38
Tabla 5: Frecuencia de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	39
Tabla 6: Riesgo Caso vs. Control.....	39
Tabla 7: Resumen de investigaciones sobre <i>E. histolytica/E. dispar</i> en Ecuador..	40

INTRODUCCIÓN

Amebiasis: concepto y epidemiología

El género *Entamoeba* integra siete especies que colonizan el intestino humano: *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi* y *E. histolytica*, las cuatro últimas son morfológicamente iguales y solo *E. histolytica* está asociada con enfermedad en el humano como agente etiológico de la amebiasis ^{1,2,3,4}.

La amebiasis es de distribución mundial y se estima que 480 millones de personas están infectadas, de las cuales 36 millones desarrollaron colitis invasiva o abscesos extra-intestinales (en su mayoría hepáticos) que causan la muerte de entre 40.000 a 100.000 personas anualmente ^{3,5,6} lo cual en una escala global, ubica a esta enfermedad como la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias después de la malaria y la esquistosomiasis ⁵. Noventa por ciento de las personas infectadas son asintomáticas (portadores sanos) ^{1,5} quienes, en su mayoría, habitan en países en vías de desarrollo ¹. En países desarrollados los casos de amebiasis se asocian a grupos de riesgo como inmigrantes provenientes de áreas endémicas, viajeros recientes a regiones de alta prevalencia o prácticas sexuales oro-anales; sin embargo hay reportes de casos de enfermedad invasiva en personas que no pertenecen a estos grupos de riesgo ⁷.

La epidemiología de la amebiasis se ha estudiado clásicamente mediante la observación microscópica (análisis coprológico), técnica que no permite la diferenciación de *E. histolytica* de las otras especies morfológicamente idénticas y consideradas no patógenas. Por esta razón se presume que su prevalencia estaría sobreestimada ^{1,5,8}. La baja incidencia de enfermedad invasiva (menos del 10%) en personas con amebiasis podría ser indicio de un diagnóstico equivocado ⁹. El uso de nuevos métodos diagnósticos que hacen posible identificar a *E. histolytica* permitirían establecer una prevalencia real.

***E. histolytica* y *E. dispar*: Dos especies morfológicamente idénticas**

En 1850 se asoció por primera vez a la *Entamoeba* con enfermedad cuando Lambal la encontró en las heces de un niño con disentería en la ciudad de Praga². En 1913 Walker y Sellards demostraron que la forma infectiva de *E. histolytica* es el quiste que causa la colitis amebiana y, que los portadores asintomáticos transmiten y/o pueden desarrollar la enfermedad en cualquier momento^{2,10}. Luego en 1925 Dobell describió 4 formas del ciclo de vida trofozoito, prequiste, quiste y la ameba metaquística. En ese mismo año el parasitólogo francés Emile Brumpt formuló la teoría de que la diferencia entre las infecciones asintomáticas y las que presentan síntomas podría estar correlacionada con la existencia de dos especies de amebas morfológicamente iguales, una capaz de causar enfermedad invasiva, a la que denominó *E. dysenteriae*, y otra causante de la infección asintomática a la que denominó *E. dispar*. Sin embargo, esta teoría fue rechazada por los científicos de la época^{1,2,10}. En 1961 Diamond *et al.* lograron obtener un cultivo axénico de *E. histolytica*, lo que posibilitó el desarrollo de estudios *in vivo* e *in vitro*. Y más tarde Sargeant y Williams (1978) demostraron por medio del análisis isoenzimático (zymodema), que las amebas cultivadas aisladas de pacientes con manifestaciones clínicas y aquellas provenientes de pacientes asintomáticos podían ser diferentes^{1,2}. Esta evidencia llevó a la hipótesis de si *E. histolytica* puede adquirir patogenicidad, es decir la expresión de patogenicidad es inducible y depende de las condiciones ambientales. La hipótesis contraria sería que las amebas patógenas y no patógenas son genéticamente distintas. Posteriormente, Tannich *et al.* (1989) demostraron que esta diferencia se debe a que son genéticamente distintas¹¹. Las investigaciones de Petri *et al.* (1987) con sueros de personas que desarrollaron absceso hepático amebiano determinaron que la proteína de superficie GAL/GalLectina, involucrada en la adherencia amebiana a los enterocitos, es altamente antigénica (95% de los pacientes habían desarrollado anticuerpos contra esta proteína)¹². En 1993 Diamond y Clark publicaron una nueva descripción de *E. histolytica* (en base a los estudios bioquímicos, genéticos e inmunológicos)⁹. Esta nueva propuesta fue regida en el Boletín Epidemiológico

de la OPS de marzo de 1997, en el que se publicó las resoluciones de la Consulta con expertos en amibiasis en Ciudad de México, en el que se establece que la *Entamoeba* patógena será denominada *E. histolytica* y la no patógena se denominaría *E. dispar* y que la observación (por microscopía) de quistes debería reportarse como quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar*. Se recomendó además implementar métodos diagnósticos que permitan diferenciar las dos amebas con el fin de dar tratamiento adecuado solo cuando se trate de *E. histolytica*, e implementar estrategias para evaluar el riesgo de que se produzca enfermedades invasivas³.

Aunque *E. dispar* no se ha considerado patógena, el uso de los nuevos métodos de diagnóstico han permitido establecer que también podría estar involucrada en procesos invasivos intestinales (Parija et al. 2005)¹ y extra intestinales; el ADN extraído de 6 abscesos hepáticos mostró secuencias correspondientes a *E. dispar*¹³, en Brasil se aisló de un paciente con colitis no disentérica la cepa ICB-ADO de *E. dispar*¹³. Harían falta más estudios para establecer la potencial patogenicidad de este organismo.

Métodos diagnósticos y el impacto de su aplicación en el estudio de la epidemiología de la amebiasis:

Durante los últimos años los estudios de la epidemiología de la amebiasis han hecho uso del cultivo (medio de Robinson) y posterior análisis de isoenzimas para diferenciar las dos especies de amebas. Adicionalmente se han usado métodos inmunológicos basados en la detección de antígenos comunes y específicos (para las dos especies de amebas) en muestras de heces y aspirado de abscesos hepáticos. Uno de los métodos más empleados es ELISA que utiliza anticuerpos monoclonales contra la lectina Gal/GalNac de *E. histolytica* (Merlin Diagnostika, Bornheim.Hersel, Alemania). La desventaja de los métodos inmunológicos es el requerimiento de al menos 1.000 trofozoitos por cada pocillo para que el antígeno sea detectado¹. Para el diagnóstico en absceso hepático se detecta anticuerpos IgM e IgG en el suero de la persona infectada. Los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido descritos para la

detección y diferenciación de las dos especies de ameba ^{1,6,10,14}. Sin embargo y a pesar de las limitaciones, la microscopia sigue siendo el único método disponible en muchos lugares debido a los altos costos que representa la utilización de los nuevos ^{1,13}. Durante algún tiempo se consideró al método de cultivo y posterior análisis de isoenzimas como la prueba de oro para la identificación de las dos amebas en heces, tejido y aspirado de absceso; sin embargo, los métodos inmunológicos y moleculares son actualmente los más utilizados pues han demostrado igual o mejor sensibilidad y especificidad frente al primero; un estudio comparativo de las técnicas de diagnóstico (cultivo y análisis de isoenzimas, ELISA y PCR anidado) mostró una correlación de 93% entre ELISA Y PCR y una sensibilidad de 87% y 85% de estos dos métodos respectivamente con respecto al cultivo y posterior análisis de isoenzimas ¹⁴. Además, el porcentaje de éxito en el cultivo de *E. histolytica* es de 50 a 70%; el crecimiento de bacterias, hongos u otros protozoos son a menudo el mayor problema, y puede darse un sesgo de selección en el que una especie puede desarrollarse más que la otra ^{1,2,8}. Otro estudio indica que la PCR del gen ADNr 18S, el cual presenta gran diversidad genética en las dos amebas, fue aproximadamente 100 veces más sensible que la mejor prueba de ELISA disponible ¹⁵. Actualmente muchas investigaciones utilizan PCR para amplificar genes que codifican SREPH, hemolisina HLY6, proteína 30-kDa, entre otros ¹.

La PCR es una prueba de diagnóstico molecular rápida, sensible y específica; sin embargo, estas características pueden verse disminuidas cuando se aplica la técnica directamente a muestras biológicas como sangre y heces debido a la presencia de compuestos inhibidores como bilirrubinas, sales biliares, complejos de carbohidratos, el grupo hemo, que a menudo son extraídos conjuntamente con el ADN del patógeno ^{1,16}. A este respecto, se ha desarrollado algunos kits de extracción de ADN de muestras fecales que han permitido obtener ADN de alta pureza, QIAamp DNA stool kit de QIAGEN, Hilden, de Alemania ^{1,10}.

En países de recursos económicos limitados con alta prevalencia de amebiasis se ha realizado muchas investigaciones en las que se ha utilizado estas nuevas técnicas de diagnóstico y los resultados han demostrado, en algunos casos, una

prevalencia sobreestimada y en otros lo contrario (Tabla 1). También se ha demostrado que esta prevalencia puede variar en distintos sectores de la misma región y en diferentes estaciones climáticas. Una investigación realizada con 16.592 muestras de heces recolectadas entre agosto de 1999 y febrero de 2002 en la zona norte, central y sudeste de Irán encontró una mayor prevalencia de *E. dispar* (92.1%) sobre *E. histolytica* (7.9%)¹⁷, mientras que otra investigación realizada en 2011 en la zona sudoeste de Irán, con 655 muestras, la prevalencia de *E. histolítica* (1.5%) fue mayor que la de *E. dispar* (0.2%)¹⁸. En Colombia, de 100 muestras reportadas positivas para el complejo *E. histolytica/E. dispar* diagnosticadas por microscopia, 8 resultaron positivas en una nueva revisión microscópica y de éstas, 6 produjeron cultivos positivos (medio de Robinson), las pruebas moleculares e inmunológicas indicaron que 1 correspondía a *E. histolytica* y 5 a *E. dispar*¹⁹, es claro que la observación microscópica inicial arrojó una frecuencia falsamente elevada. En Tanzania, 842 muestras de portadores asintomáticos y personas con algunos problemas gastrointestinales, mostró que la observación microscópica del complejo *E. histolytica/E. dispar* frente al diagnóstico por ELISA de las dos amebas presentó una sensibilidad de 39% y una especificidad de 96%, lo que indica que con la observación microscópica se pasan por alto el 61% de la parasitosis debidas a este complejo amebiano²⁰.

***Entamoeba histolytica*: Fisiología, estructura y patogenicia**

La forma infectiva de *Entamoeba histolytica* es el quiste cuyo tamaño oscila entre 10 y 20 μm con un promedio de 15 a 20 μm y presenta entre 1 y normalmente 4 núcleos. Un paciente infectado elimina en sus heces trofozoitos no infecciosos que no sobreviven en el ambiente externo y quistes que contaminan el agua y alimentos²¹. Los trofozoitos también pueden ser infectantes en la práctica de sexo oral - anal y cuando hay contacto de heces con laceraciones^{22,23}. Una vez que los quistes son ingeridos, atraviesan el estómago donde los jugos gástricos estimulan la liberación del trofozoito en el duodeno²¹ donde se replica por fisión binaria en el moco que recubre el intestino o también mediante el desarrollo de numerosos trofozoitos en el interior del quiste multinucleado maduro. El trofozoito

tiene un diámetro de 10 - 60 μm con un promedio de 15 – 30 μm , su forma es alargada con un único núcleo redondo que tiene un cariosoma central y presenta una distribución uniforme de gránulos de cromatina alrededor de la membrana nuclear. El trofozoito se moviliza mediante la extensión de un pseudópodo con la extrusión del ectoplasma celular y posterior arrastre del resto de la célula que se reúne con el pseudópodo ²¹, estos movimientos direccionales progresivos los realiza gracias al impulso, provocado por la inestabilidad dinámica de la presión hidrostática intracelular, que recibe del uroide (localizado en la parte posterior del trofozoito) que está constituido de miosina y actina ²⁴. Esta inestabilidad dinámica de la presión hidrostática intracelular de la ameba también hace posible su movimiento en dos y tres dimensiones gracias a la generación cíclica de vesículas que se forman y se regeneran en la membrana del parásito con velocidades y direcciones al azar ²⁵. Con estos movimientos la ameba es capaz de invadir el epitelio y avanzar a tejidos distantes ²². En el inicio de la invasión, la interacción de los antígenos de superficie del parásito con los anticuerpos del hospedero produce complejos de antígeno-anticuerpos que se distribuyen en toda la superficie del parásito y, en un sorprendente y rápido movimiento estos complejos se deslizan hacia el uroide y se van aglutinando hasta formar capas bien definidas, en un proceso conocido como “capping” y es considerado una de las principales estrategias que tiene el parásito para evadir la respuesta inmune del hospedador. Esta movilización de los complejos antígeno-anticuerpo se realiza por un mecanismo en el que se produce un deslizamiento de actina y miosina mediada por una proteína y una cinasa de cadena ligera de la miosina ²⁶. En un estudio se demostró que la cantidad de miosina II está tres veces más concentrada en el uroide que en el resto del parásito ²⁷, lo cual podría explicar la habilidad de *E. histolytica* para regenerar rápidamente cantidades sustanciales de la membrana plasmática, lo cual junto con el proceso de capping puede contribuir a la supervivencia del parásito durante la infección ^{26,27}.

Adhesión: *Entamoeba histolytica* se considera un patógeno agresivo debido a su actividad citotóxica y citolítica, investigaciones realizadas desde 1975 sugieren

que realiza un proceso de invasión muy elaborado, en el cual se secretan y expresan proteínas que le permiten adherirse al epitelio, degradar la matriz extracelular y producir citólisis de las células epiteliales para penetrar dentro de la mucosa. Además, fagocita activamente bacterias y desechos de las células del hospedador que le sirve de alimento ²⁸. Una de las funciones de la mucosa intestinal, es la defensa contra agentes infecciosos a través de la activación del sistema inmunitario innato cuyos mecanismos eliminan casi todas las infecciones intestinales con rapidez y evitan diseminación extraintestinal ²⁹. En el inicio de la invasión los trofozoitos, mediante la subunidad pesada 170 kDa de la lectina Gal/GalNAc, se adhieren a oligosacáridos de las células de la mucosa del colon ³⁰. La acción de la mucosa intestinal puede inhibir la adherencia de la lectina Gal / GalNAc sin embargo la ameba produce glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucosidasa, xilosidasa, glucoronidasa, y N-acetil-D.galactosaminidasa, lo cual altera la mucosa y permite mayor acceso a las proteasas y otras sustancias secretadas por la ameba ²⁸. La subunidad liviana de lectina (35/31 kDa) Gal / GalNAc parece contribuir a la regulación de la adherencia y a la señalización de eventos asociados con la virulencia ²⁸. La lectina Gal / GalNAc está involucrada, también, en el proceso de adhesión a eritrocitos, neutrófilos, bacterias y células epiteliales ^{28,30} y probablemente en el proceso de señalización que conduce a la citólisis ya que la proteína purificada no mostró efectos citotóxicos aun en alta concentración ³⁰. Otras moléculas que se cree participan en el proceso de adhesión del parásito son: una lectina de 220 kDa, una adhesina de 112 kDa rica en serina (SREHP) y un lipofosfoglucono de superficie.

Lisis tisular:

Luego de la adhesión se produce un fenómeno citolítico muy rápido que resulta en la hinchazón, agrandamiento y finalmente en la muerte de la célula blanco a causa de la permeabilización de la membrana celular por péptidos formadores de poros (ameboporos) ³⁰ o a causa de la inducción de apoptosis ²². Los ameboporos son enzimas proteolíticas solubles (contenidas en vesículas citoplasmáticas) que tienen acción colagenasa y proteasa, lo cual facilita la invasión de los tejidos.

Pertenece a la familia SAPLIP (saposin-like proteins) que se caracterizan por tener un motivo conservado de residuos de seis cisteínas unidas por tres puentes y comprenden tres isoformas, ameboporo A, ameboporo B y ameboporo C, y son producidas en una proporción de 35:10:1^{28,30}. Se cree que los ameboporos se agregan por medio de un reordenamiento de sus hélices y forman un canal dentro de la membrana plasmática de la célula, a través de la cual pasan agua, iones y otras moléculas pequeñas, ocasionando finalmente, la lisis celular^{22,28,30}. Se ha demostrado que *E. dispar* también tiene ameboporos A y B en menor concentración²². Después del contacto del parásito con la célula diana, ésta sufre una importante elevación de Ca^{++} que es irreversible y precede a su destrucción, las células alrededor de éstas también sufren de esta elevación pero no mueren, por lo que se deduce que la sola elevación de calcio no es suficiente para matar la célula³¹. Es probable que esta acción sea causada por la lectina Gal / GalNAc. La ameba también posee una actividad fosfolipasa calcio-dependiente que parece contribuir a la citotoxicidad³¹. En cuanto a la inducción de la apoptosis, se cree que es por medio de la vía caspasa 3 cuya activación es contacto-dependiente. Este fenómeno se evidenció en un estudio de fagocitosis con células Jurkat (Huston et al. 2003) en el que el 88% de las células fagocitadas por *E. histolytica* fueron apoptóticas y presentaron actividad de caspasa 3. En este mismo estudio se mostró que la apoptosis precede a la fagocitosis por el hecho de que un mayor porcentaje de trofozoitos ingirió más células apoptóticas (62%) que células vivas (30%) y necrosadas (8%) sin embargo, es todavía un enigma el hecho de que el parásito sea capaz de efectuar la apoptosis en cuestión de minutos, cuando normalmente se requiere horas para un proceso completo²⁷.

Factores de virulencia:

Se ha identificado 50 genes que codifican cisteína proteasas, y se ha demostrado que éstas enzimas proteolíticas son secretadas por la *E. histolytica* dentro de su microambiente y constituyen factores de virulencia esenciales que destruyen los tejidos humanos, pues degradan distintos componentes de la matriz extracelular y separan las células para facilitar la invasión^{22,31}. Más del 80% de pacientes con

amebiasis expresan anticuerpos contra cisteína proteasas amebianas ³¹. EhCP1, EhCP2 y EhCP5 están localizadas dentro de las vacuolas digestivas y son las responsables de aproximadamente el 90% de toda la actividad de las cisteínas proteasas. Las EhCP5 y EhCP112 se encuentran en la superficie del trofozoito; EhCP5 juega un papel crucial en la producción de la inflamación que lleva a la formación de abscesos hepáticos ²².

La respuesta inmune:

La respuesta inmune del hospedador puede contribuir al daño del tejido y facilitar el proceso de invasión. Se ha visto que, en cultivos de trofozoitos con diferentes líneas celulares, hubo un aumento de citocinas proinflamatorias; igualmente, se ha demostrado que las cisteína proteasas estimulan la señalización proinflamatoria ³¹, participan en la evasión de la respuesta inmune humoral al degradar IgA e IgG ³⁰ y la proteína precursora pro IL-18 responsable de la maduración de la citocina IL-18 la cual es importante en los procesos proinflamatorios y la respuesta Th1. Inducen también la activación de macrófagos y la secreción de IFN γ . Los neutrófilos no eliminan a los trofozoítos y contribuyen al daño tisular y la diarrea mediante la liberación de sus gránulos citotóxicos²². Se ha demostrado también que la ameba desarrolla resistencia al complemento después de una exposición repetida al suero activo humano, y recupera la susceptibilidad a la lisis (dependiente del complemento) después de 6 semanas de terminados los tratamientos con suero, lo que sugiere que esta propiedad no es debido a cambio genético sino a una adaptación al suero. En otra investigación se demostró que la molécula de lectina Gal / GalNAc también tiene funciones inhibitoras del complemento, pues parece que se une a C8 y C9 y previene la formación del complejo de ataque de membrana y subsecuentemente la lisis celular ³⁰.

Los trofozoitos remueven células apoptóticas opsonizadas y necróticas, bacterias y eritrocitos, que pueden ser utilizados como fuente de hierro ²²; la muerte de la célula diana del hospedero y la fagocitosis son las características centrales de la amebiasis invasiva, la fagocitosis sigue a la muerte celular por apoptosis, una

investigación sobre fagocitosis demostró que el trofozoito reconoce y fagocita células sometidas a apoptosis más eficientemente que las células vivas o necrosadas o simplemente no apoptóticas, la adherencia a las células apoptóticas se realiza a través de la lectina Gal / GalNAc; sin embargo, hay evidencia de que otro receptor en la ameba con un rol pequeño en el proceso de adhesión, está involucrado y es capaz de desencadenar la fagocitosis ²⁷.

La apoptosis y fagocitosis de las células del hospedero por parte de *E. histolytica* pueden limitar la inflamación y permitir a la ameba evadir la respuesta inmune para lograr una infección persistente ^{27,28}.

Factores que influyen en el desarrollo de la amebiasis invasiva:

Todas las infecciones debidas a *E. histolytica* deberían ser tratadas debido a su potencial riesgo de causar enfermedades invasivas ³², las cuales no son mutuamente excluyentes y pueden progresar a una u otra manifestación clínica o manifestar ambas, y también para minimizar la propagación del parásito. Del 10% de las personas infectadas que evolucionan a enfermedades invasivas, 10% a 25% desarrollan colitis amebiana, mientras que el absceso hepático amebiano ocurre en el 1% de los casos, comúnmente en hombres adultos ³¹. Entre los factores que favorecen el desarrollo de esta condición está la genética del paciente y la genética del parásito. En un estudio en Bangladesh se realizó ensayos para determinar diversidad genética del parásito en muestras de pacientes asintomáticos, con disentería/diarrea y con absceso hepático; los genotipos de la ameba encontrados fueron significativamente diferentes entre los tres grupos. En otro estudio se determinó que el genotipo fue diferente cuando provenía de una muestra de heces y cuando provenía de un absceso hepático en el mismo paciente ³¹. En otro estudio se encontró un genotipo diferente en 2 abscesos hepáticos amebianos en el mismo paciente ³¹. Se ha demostrado que factores ambientales como la malnutrición aumenta la susceptibilidad de contraer la infección. También se ha reportado cambios en la virulencia de *E. histolytica* que dependen de la presencia de diferentes especies bacterianas; en ensayos *in vitro* ³¹, la presencia de las bacterias patógenas *Escherichia coli* enteropatógena

(EPEC), y *E. shigellae* aumentaron el efecto citopático de *E. histolytica* y la expresión de Gal/GalNAc lectina sobre la superficie amebiana debido a un aumento de la actividad cisteína proteasa, la adhesión de las amebas y el daño a las células causado por bacterias. Las monocapas epiteliales expuestas a las bacterias enteropatógenas mencionadas, se vuelven más susceptibles al daño por la ameba, además la fagocitosis de las bacterias patógenas por la ameba aumenta el daño de la célula epitelial ³³.

La amebiasis en Ecuador:

En el Ecuador no hay cifras oficiales de la amebiasis ni de su distribución geográfica. La Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica no considera a *E. histolytica* entre los microorganismos involucrados en el Síndrome Diarreico Agudo ni tampoco como parte de los microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por agua y alimentos ³⁴. Sin embargo, la Región Andina de América del Sur está considerada como región endémica de amebiasis lo que ha llevado a algunos organismos de salud al uso continuo de anti amebianos, práctica que está contraindicada por la OMS ³. Los resultados de los estudios realizados en diferentes regiones del país para investigar la relación de este parásito con síndromes diarreicos ³⁵ o su prevalencia en poblaciones rurales y urbanas ^{6,36,37,38,39,40,41,42} muestran un grave problema, seis de las ocho investigaciones usan microscopía y reportan una alta frecuencia de *E. histolytica*/*E. dispar* ^{6,36,37,38,40,41}. Las investigaciones en las que se realizan métodos de diagnóstico para diferenciar las dos amebas, indican que la frecuencia de *E. dispar* es mayor que la de *E. histolytica* ^{6,38} en una de ellas se reporta ausencia de amebiasis ³⁸. Dos investigaciones reportan una baja frecuencia de amebiasis por el método microscópico (1% y 1.5%), una de estas reporta una frecuencia de 1% por el método de PCR ^{38,42}. Adicionalmente, *E. histolytica* parecería no estar asociada a enfermedad diarreica ³⁵; sin embargo, los portadores asintomáticos que eliminan los quistes constituyen la principal fuente de contagio. Desde el punto de vista epidemiológico es importante su identificación y tratamiento ²¹.

REFERENCIAS

1. Fotedar, R., D. Stark, N. Beebe, D. Marriott, J. Ellis, y J. Harkness, 2007. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 511-532. doi:10.1128/CMR.00004-07
2. Pinilla A, López M, Viasus D. 2008. History of the *Entamoeba histolytica* protozoan. *Rev Méd Chile*.136: 118-124
3. World Health Organization, 1997. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis.
4. Parija S, Mandal J, and Ponnambath, D.K, 2014. Laboratory methods of identification of *Entamoeba histolytica* and its differentiation from look- alike *Entamoeba* spp. *Tropical Parasitology*, 4(2), 90-95. doi:10.4103/2229-5070.138535
5. Walsh Julia, 1986. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Reviews of Infectious Diseases*, 8(2), 228-238.
6. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo, Bruno A, Maserati R, Bisoffi Z, Scaglia M, 2002, Infecciones amebianas debidas al complejo *Entamoeba histolytica* – *Entamoeba dispar*. Un estudio de la incidencia en una remota área rural de Ecuador, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
7. Skappak C, Akierman S, Belga S, Novak Kerri, Chadee K, Urbanski S, Church D, Beck P, 2014. Invasive amoebiasis: A review of *Entamoeba* infections highlighted with case reports. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28(7):355-359 PMC4144452.
8. World Health Organization, 1969. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis.
9. Diamond LS, Clark CG, 1993, A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, *J Eukaryot Microbiol* ; 40(3), 340-4.
10. Tanyusksel, M., Petri W, 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*: 713–729.

11. Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J., Arnold, H. H. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(13), 5118–5122.
12. Petri w, Joyce P, Broman J, Smith R, Murphy C, Ravdin J. 1987 Recognition of the Galactose-or N-Acetylgalactosamine-Binding Lectin of *Entamoeba histolytica* by Human immune Sera, American Society of Microbiology, 55(10), 2327-2331.
13. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, Cerritos R, González E, Hernández E, and Oswaldo P, 2011. Novelties on Amoebiasis: A Neglected Tropical Disease, Journal of Global Infectious Diseases 3(2), 166-174. doi:10.4103/0974-777X.81695
14. Haque R, Ali ik, Akther s, Petri w Jr., 1998, Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection, Journal of Clinical Microbiology, 36(2), 449–452
15. Mirelman D1, Nuchamowitz Y, Stolarsky T, 1997, Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*, Journal of Clinical Microbiology, 35(9), 2405-2407
16. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C, 2004, Pre-PCR Processing Strategies to Generate PCR-Compatible Samples, Molecular Biotechnology Human Press Inc. 26(2), 133-146
17. Hooshyar H, Rezaian M, Kazemi B, Jeddi-Tehrani M, Solaymani-Mohammadi S. 2004, The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central, and southern Iran, Parasitol Res 94, 96-100
18. Pestehchian N, Nazary M, Haghighi A, Salehi M, Yosefi H, 2011, Frequency of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* prevalence among patients with gastrointestinal complaints in Chelgerd city, southwest of Iran, Journal of Research in Medical Sciences, 16(11), 1436-1440
19. López O, López M, Corredor V, Echeverri M, Pinilla A, 2012, Differentiation of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* using Gal/GalNAc-lectin and polymerase chain in Colombian isolates reaction, Rev Med Chile, 140, 476-483
20. Nesbitt R, Moshawar FW, Katki H, Ashraf M, Assenga C, Lee, 2004, Amebiasis and Comparison of Microscopy to ELISA technique in detection

- of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*, Journal of the National Medical Association vol. 96, no. 5, 671
21. Murray P, Rosenthal Ken, Pfaller Michael, 2007. Microbiología Médica, Madrid, Elsevier España S.A., 847 – 850.
 22. Uribrren T, 2015, Entamoebosis o Amibiasis o Amebiasis, disponible desde <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>, Universidad Autónoma de México
 23. Pak-On Leung a,1, Kou-Huang Chen b,1, Kwo-Liang Chen b, Yu-Ting Tsai c, Shyun-Yeu Liu d, Kow-Tong Chen c,e, 2014, Epidemiological features of intestinal infection with *Entamoeba histolytica* in Taiwan, 2002e2010, Travel Medicine and Infectious Disease, 12(6PtA), 637-639.
 24. Ralston K, Petri W Jr. 2011, Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*, NIH Public Access, Author Manuscript, Trends Parasitol; 27(6), 254–263. doi:10.1016/j.pt.2011.02.006.
 25. Maugis B, Brugués J, Nassoy P, Guillen N, Sens P, Amblard F, 2010. Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility, Journal of Cell Science 123, 3884-3892, 2010 doi:10.1242/jcs.065672.
 26. Chávez-Munguía B, Talamás Rohana P, Castañón G, Salazar-Villatoro L, Hernández-Ramírez V, Martínez-Palomo A, 2012, Differences in cap formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*, Springer-Verlag Parasitol 111, 215-221.
 27. Huston C, Boettner D, Miller-Sims V, Petri Jr. W., 2003, Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*, Infection and Immunity, Feb; 71(2), 964-972.
 28. Trejos J, Castaño JC., 2009, Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. Asociación Colombiana de Infectología, Infectio, 13(2),100-110.
 29. Murphy K, Travers P, Waolport M, 2009, Inmunobiología de Janeway, México, McGrawHill, 476-490.
 30. Solaymani- mohammadi S, William A. Petri Jr. 2008, Intestinal Invasion by *Entamoeba histolytica*, NIH Public Access, 2008, 47, 221-232.
 31. Ralston K, Petri W Jr. 2011, Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*, NIH Public Access, Author Manuscript, Trends Parasitol; 27(6), 254–263. doi:10.1016/j.pt.2011.02.006.

32. Fletcher S, Stark D, Harkness J, Ellisa J, 2012, Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective, *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 420-4491
33. Galván-Moroyoqui JM, Domínguez Robles M, Meza F, 2008. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PLOS Neglectec Tropical Diseases*, 2 (7), Jul, PMC2447883.
34. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013, Manual de procedimientos del subsistema alerta acción sive – alerta, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica,
https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual_de_procedimientos_sive-alerta.
35. Vasco G, Trueba G, Atherton R, Calvopiña M, Cevallos W, Andrade T, Eguiguren M, Eisenberg J, 2014, Identifying Etiological Agentes Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities, *Tropical Medicine and Hygiene* 91(3), 2014, 563-569.
36. Jacobsen K, Ribeiro P, Quist B, Rydbeck B, 2007, Prevalence of Intestinal Parasites in Young Quichua Children in the Highlands of Rural Ecuador, *J HEALTH POPUL NUTR* 2007 Dec 25(4), 399-405 ISSN 1606-0997.
37. M.M. Weigel A. Calle, R.X. Armijos, I.P. Vega, B.V. Bayas, C.E. Montenegro, 1995, The effect of chronic intestinal parasitic infection on maternal and perinatal outcome, *International Journal of Gynecology Obstetrics*.
38. Levecke B, Dreesen L, Barronuevo-Samaniego M, Benitez W, Praet N, Brandt J, Dorny P, 2011, Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. In a rural community of Loja province, South Ecuador, *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 737-739.
39. Guderian R, Ordoñez G, Bozano R, 1987, Diarrea Aguda Asociada a *Campylobacter* y otros Agentes Patógenos en Quito, Ecuador. *Bol Oficina Sanit Panam* 102, 333-339.
40. Rinne S, Rodas EJ, Galer-Unti R, Glickman N, Glickman LT, Prevalence and risk factors for protozoan and nematode infections among children in an Ecuador Highland community, 2005, *Tropical Medicine and Hygiene*, Aug;99(8), 585-592.
41. Cho SY, Kim JH, Park SH, 1990, Status or intestinal parasite infections in inhabitants of Palmar, Guayas Province, Ecuador, *The Korean journal of parasitology* Jun;28(2), 109-13.

42. Mejía R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper P, Nutman T, 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, *Tropical Medicine and Hygiene* Jun 5; 88(6), 1041-1047.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

TITULO

Investigación de *Entamoeba histolytica* en dos Comunidades Ecuatorianas

AUTORES

Thamara Andrade, Sonia Zapata, Gabriel Trueba, Gabriela Vasco, Richard Atherton, Manuel Calvopiña, William Cevallos, Martha Eguiguren y Joseph N.S. Eisenberg*

Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

Centro de Biomedicina, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

Departamento de Epidemiología, Universidad de Michigan, Ann Arbor Michigan, United States, Centro de Salud de Guamaní, Ministerio de Salud Pública, Quito, Ecuador.

*Correspondencia a Joseph Eisenberg, Universidad de Michigan, Estados Unidos de América. jnse@umich.com

Palabras clave: Amebiasis, Colitis y enfermedad extraintestinal, Epidemiología.

INTRODUCCIÓN

La amebiasis es una infección causada por el protozoo intestinal *Entamoeba histolytica*, cuyo único hospedador es el humano. Se estima que 480 millones de personas de todo el mundo están infectadas, 36 millones de ellas desarrollaron colitis invasiva o abscesos extra-intestinales y entre 40,000 a 100,000 personas mueren anualmente a causa de esta parasitosis. Globalmente, esta enfermedad es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias (después de la malaria y la esquistosomiasis) ¹. La mayor morbilidad y mortalidad se ha reportado en regiones de Centroamérica, Sudamérica, África, y el subcontinente Indio ² se ha relacionado a esta parasitosis con pobreza, insalubridad, hacinamiento y prácticas sexuales anales-orales ^{3,4}, mala infraestructura sanitaria, agua o alimentos contaminados ^{3,5}.

La amebiasis es clásicamente diagnosticada por microscopía mediante la identificación de quistes y trofozoitos de *E. histolytica* en heces. Esta técnica no permite diferenciar *E. histolytica* de las tres especies morfológicamente idénticas, no patógenas *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi* por lo que se presume que la prevalencia de amebiasis está siendo sobreestimada ^{2,6,7}.

En los países y regiones donde se ha reportado alta prevalencia de amebiasis, el uso de nuevos métodos moleculares e inmunológicos para el diagnóstico ha demostrado una prevalencia sobreestimada en unos casos y en otros lo contrario (Tabla 1). También se ha demostrado que esta prevalencia puede variar en sectores distintos de la misma región y en diferentes estaciones climáticas ¹⁰. El método microscópico si bien tiene un bajo costo, requiere un profesional con mucha experiencia en la observación tanto de quistes como de trofozoitos de amebas, generalmente los trofozoitos son confundidos con macrófagos y los quistes con leucocitos polimorfonucleares. Para que los trofozoitos puedan ser observados, las muestras deben ser examinadas al cabo de una hora de tomada la muestra, de lo contrario se destruyen, estas limitantes dan como resultado bajos

porcentajes de sensibilidad (25-60%) y especificidad (10-50%) para este método². Estos datos sugieren el uso de metodologías que permitan detectar un mayor número de infecciones y que tengan una alta especificidad para diferenciar las especies con miras a obtener una prevalencia real de amebiasis. El presente trabajo fue parte de un estudio de caso – control en muestras de heces de poblaciones urbana y rural, recolectadas durante la época lluviosa. El propósito del trabajo fue contrastar la eficacia de la microscopía y las técnicas moleculares (PCR) en la detección de *E. histolytica* y *E. dispar* y conocer la frecuencia de estas dos especies.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio y colección de muestras

Se llevó a cabo un estudio de caso-control con 346 muestras de heces fecales obtenidas de dos poblaciones, una urbana de pacientes que acudieron al Centro de Salud de Guamaní, (100 muestras de casos y 100 muestras control); y otra rural de habitantes de la comunidad de Borbón, (39 muestras de casos y 107 de control). Se definió como caso de diarrea una persona que tiene tres o más deposiciones blandas o líquidas durante un período de 24 horas¹ y como control una persona de la misma edad quien no presenta diarrea. El Centro de Salud está ubicado en la parroquia urbana Guamaní, en la zona sur-oriental de la ciudad de Quito, capital del Ecuador, perteneciente al Cantón Quito, provincia de Pichincha en la región interandina ecuatoriana y su población es de 62.065 habitantes. Borbón es una parroquia rural de 192,57 Km² de superficie, puerto fluvial maderero, perteneciente al Cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas en la región litoral ecuatoriana cuya población es de 7.696 habitantes¹⁰. Se incluyó en el estudio a todos los casos sin distinción de edad y género. En el Centro de Salud de Guamaní, por cada caso se seleccionó un control que fue obtenido de las personas de la misma edad, que acuden a esta casa de salud y que no presentaron diarrea por lo menos dos semanas antes del momento de la obtención de la muestra. En Borbón se realizó un estudio de caso y control de base poblacional con una cohorte de 400 viviendas. Los casos fueron

identificados durante un seguimiento de 2 semanas con visitas diarias a cada vivienda, por cada caso se seleccionó un promedio de 3 controles de la misma edad que fueron obtenidos de los habitantes dentro del cohorte que no presentaron diarrea por lo menos una semana antes del momento de la obtención de la muestra. En el Centro de Salud de Guamaní las muestras fueron colectadas en la época lluviosa entre los meses de marzo y mayo de 2012, período en el que la temperatura ambiente promedio fue de 12.3°C y la precipitación pluvial acumulada fue de 196.1 mm en marzo ¹³, 218.6 mm en abril ¹⁴ y 63.1 mm en mayo ¹⁵, mientras que en Borbón las muestras fueron colectadas también en la época lluviosa en los meses de julio y agosto de 2012, período en el que la temperatura ambiente promedio fue de 26°C y la precipitación acumulada fue de 12.1 mm en julio ¹⁶ y 21.0 mm en agosto ¹⁷ (Tabla 2). El criterio de exclusión en las dos poblaciones fue el uso de antibióticos/antiparasitarios una semana antes de la toma de muestra de heces fecales. El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética tanto de la Universidad de Michigan como de la Universidad San Francisco de Quito. Todos los participantes mayores de edad y los tutores de los menores de edad aceptaron su participación en esta investigación a través de la firma del consentimiento informado.

Transporte y conservación de las muestras

Las muestras fueron colectadas y entregadas por los pacientes o sus familiares dentro de la hora siguiente a la recolección. Las muestras de Guamaní fueron conservadas entre 4 y 8°C y transportadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito dentro de un recipiente con hielo. Una alícuota de la muestra se diluyó en formalina al 10% para la observación microscópica de quistes de *E. histolytica/dispar* y aproximadamente 200 mg de cada muestra se almacenó en microtubos de 2 mL a -80°C. Una alícuota de las muestras colectadas en Borbón, aproximadamente 200 mg, se introdujo en microtubos de 2 mL los cuales se conservaron y transportaron en nitrógeno líquido hasta el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Todas las muestras permanecieron congeladas a -80°C hasta el momento de ser analizadas.

Identificación de *E. histolytica* y *E. dispar*

Método microscópico: Las muestras fueron examinadas al microscopio usando la técnica de concentración formol-éter y luego se coloreó con una solución de lugol, cada muestra se observó por duplicado con el objetivo 40X ².

Método de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción y purificación de ADN: Se utilizó el kit comercial de extracción QIAamp DNA stool (QIAGEN®), y se siguió todas las indicaciones y recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el eluido de la columna se midió la concentración de ADN por espectrofotometría en el equipo NanoDrop de ThermoScientific y se almacenó en alícuotas de 60 μL a -20°C hasta el momento de realizar la PCR.

Se utilizó un protocolo previamente publicado ¹⁸ ajustado a un volumen final de reacción de 20 μL (tabla 3).

Los primers utilizados fueron sintetizados por InvitrogenTM (USA) y amplifican un fragmento del gen SREHP que codifica para una proteína de superficie rica en serina presente en las dos especies, pero específica para cada una de ellas. Los primers específicos para el gen SRPEh (*E. histolytica*) generan un fragmento de 553 pb, mientras que los primers específicos para el gen SRPEd (*E. dispar*) uno de 567 bp ^{2,18}. Las reacciones de amplificación de la secuencia de *E. histolytica* se realizó siguiendo los siguientes pasos: denaturación inicial a 96°C por 10 minutos, luego 35 ciclos de amplificación, cada ciclo incluye una denaturalización a 94°C (1 minuto), alineamiento a 64°C (1.5 minutos) y polimerización a 72°C (2 minutos); y, un paso final de extensión a 72°C (8 minutos). Para la amplificación de la secuencia específica de *E. dispar* se cumplió con el mismo protocolo, pero con una temperatura de alineamiento de 60°C ¹⁸.

Los productos de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% en TBE buffer con bromuro de etidio en concentración del 0.6%.

El control positivo se obtuvo de muestras de heces donadas por el Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez (hoy Instituto Nacional de

Investigación en Salud Pública I.N.S.P.I) de la ciudad de Guayaquil, positivas por microscopía para *E. histolytica*/*E. dispar*. Se realizó la secuenciación del producto de la PCR de una de las muestras positivas y el resultado del alineamiento, utilizando el programa Blast que compara con las bases de datos del National Center Biotechnology Information, confirmó *E. histolytica*. El control positivo para *E. dispar* se obtuvo de una de las muestras analizadas en esta investigación y para confirmar la identidad de la ameba se procedió de la misma manera que con *E. histolytica*. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción sin ADN; para comprobar la especificidad se utilizó ADN del control positivo de *E. histolytica* con los primers para *E. dispar* y los primers de *E. histolytica* con el ADN de *E. dispar*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa EpiInfo 7.1.0.6 de CDC Atlanta, USA, un valor de $p < 0,01$ fue considerado como el nivel crítico de significancia. Calculamos Odds Ratio pareado con el 95% de intervalo de confianza para comparar el patógeno presente en las muestras de caso y control.

RESULTADOS:

La observación microscópica de las 200 muestras colectadas en el Centro de Salud de Guamaní dio como resultado 5 muestras positivas para quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* que corresponde al 2.6 %. El ensayo por PCR de las mismas muestras dio como resultado 58 muestras positivas para *E. histolytica* y/o *dispar* que corresponde a 29%. De las 5 muestras positivas por microscopía, 3 coincidieron con pruebas positivas por PCR, 1 fue positiva para *E. histolytica* y 2 para *E. dispar*, las 2 restantes resultaron negativas por PCR. Con estos resultados, la prueba microscópica en Guamaní mostró una sensibilidad de 51.3% y una especificidad del 98.6%, asumiendo la PCR como prueba de referencia (Tabla 4).

La observación microscópica de las 146 muestras colectadas en Borbón dio como resultado 21 muestras positivas para quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* que corresponde al 14.4 % de las muestras. El ensayo por PCR de las mismas

muestras dio como resultado 26 muestras positivas para *E. histolytica* y/o *E. dispar* que corresponde al 17.8% de las muestras. De las 21 muestras positivas por microscopía, 5 coincidieron con pruebas positivas para *E. dispar* por PCR. Con estos resultados, la prueba microscópica en Borbón mostró una sensibilidad de 55.3% y una especificidad del 88.2%, asumiendo la PCR como prueba de referencia (Tabla 4).

No hubo diferencia estadísticamente significativa ni en sensibilidad ni en especificidad entre el método microscópico y la PCR ($p = 0.12$).

La caracterización molecular dio como resultado en Guamaní 26 muestras positivas para *E. histolytica*, (13% del total de muestras) y 32 muestras positivas para *E. dispar* (16% del total de muestras), 7 muestras dieron positivo para las dos especies (3.5% de co-infección del total de muestras). En Borbón, 5 muestras fueron positivas para *E. histolytica* (3.4% del total de muestras) y 21 muestras fueron positivas para *E. dispar* (14.4% del total de las muestras), no hubo coinfección (Tabla 5).

En la población de Guamaní, de las 26 muestras positivas para *E. histolytica*, 17 correspondieron a casos; en Borbón de las 5 muestras positivas para *E. histolytica*, 3 correspondieron a casos, datos que determinan un OR de 2.07 CI 95% (0.87 - 4.89) en Guamaní y 4.37 CI 95% (0.70 - 7.24) en Borbón (Tabla 6).

DISCUSIÓN

La introducción de técnicas moleculares en el diagnóstico de amebiasis ha demostrado que la microscopía es una técnica inadecuada para el diagnóstico; en muchos casos ha causado sobreestimaciones y en otros subestimaciones (Tabla 1). También se ha demostrado (mediante técnicas moleculares e inmunológicas) que esta prevalencia puede variar en sectores distintos de la misma región y en diferentes estaciones climáticas¹⁹. En nuestro estudio la frecuencia de *E. histolytica* encontrada en Borbón fue del 3.4% y de *E. dispar* 14.4% lo que tiene concordancia con los resultados obtenidos por Gatti *et al.*⁸ en la misma zona (18.9% de *E. histolytica* y 70.3% de *E. dispar*), pero se contrapone con otro estudio realizado en una comunidad de la misma provincia de Esmeraldas que

mostró una frecuencia baja de *E. histolytica* tanto por microscopía (1.5%) como por el método molecular (1%)²⁰ (Tabla 7). En Loja²¹ otro estudio mostró ausencia de *E. histolytica* y una frecuencia de 22.8% de *E. dispar*; sin embargo la caracterización molecular se realizó únicamente en las muestras que resultaron positivas por el método microscópico el cual, debido a su baja sensibilidad, es probable que no haya detectado más muestras infectadas. En todas las investigaciones en Ecuador que han podido diferenciar las dos amebas, la frecuencia de *E. histolytica* es siempre menor que la de *E. dispar*.

La baja sensibilidad del método microscópico frente al método de PCR en muestras de las dos poblaciones (51.3% y 55.3% en Guamaní y Borbón respectivamente), concuerda con otros estudios realizados en diferentes partes del mundo como en Brasil en donde en una investigación realizada en una población estudiantil del sudeste del país la sensibilidad del método microscópico frente a uno inmunológico por ELISA fue del 20%²². Por otro lado, en una investigación realizada en Tanzania con una muestra de 842 personas, la sensibilidad y especificidad del método microscópico frente a uno inmunológico por ELISA fue de 39% y 96% respectivamente, lo que indica que con la observación microscópica se pasan por alto el 61% de la parasitosis debidas a este complejo amebiano²³. En un estudio en Vietnam y Sudáfrica la prevalencia encontrada por el método microscópico fue de 9.2% mientras que por el método molecular de PCR fue de 14.3% en la misma población estudiada²⁴.

Los resultados de las investigaciones realizadas en el Ecuador en las que se reporta una alta prevalencia o frecuencia de *E. histolytica/E. dispar*^{8,21,25,26,27,28} (Tabla 7) mediante el uso del método microscópico, debería analizarse con precaución ya que podría tratarse de una sobreestimación incluso de quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar* que suele confundirse con los de *E. hartmanni*, *E. coli* e inclusive *Dientamoeba fragilis*^{8,21}. En nuestra investigación, de las 21 muestras reportadas como positivas por microscopía en la población de Borbón, solo 5 fueron positivas por PCR para una de las dos especies (especificidad 88.2%). Esto también concuerda con un estudio realizado en Colombia (Tabla 1) en el que de 100 muestras reportadas positivas para el complejo *E. histolytica/E.*

dispar por microscopía, solo 6 resultaron positivas para una de las dos especies por cultivo, ELISA y PCR ³⁰, es claro que la observación microscópica inicial arrojó una frecuencia falsamente elevada.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La frecuencia de *E. histolytica* es menor que la de *E. dispar* en las dos poblaciones estudiadas, lo que tiene concordancia con otros estudios realizados en el Ecuador y países que tienen características socioeconómicas similares como Brasil, Colombia, Iran; la técnica PCR convencional mostró tener más sensibilidad y especificidad que la microscopía; sin embargo, no hubo una diferencia significativa, sería recomendable realizar otros estudios con un mayor número de muestras.

Es necesario realizar investigaciones en diferentes regiones del país para establecer prevalencias, pues hay evidencia de que la epidemiología puede no ser la misma aún en regiones vecinas.

Más estudios de casos y controles permitirían determinar el riesgo que representa la amebiasis para desarrollar enfermedad invasiva. En este estudio *E. histolytica* parecería no estar asociada a enfermedad diarreica en ninguna de las dos poblaciones, sin embargo el riesgo en Borbón es aproximadamente el doble que en Guamaní. Finalmente, los portadores asintomáticos que eliminan los quistes constituyen la principal fuente de contagio y desde el punto de vista epidemiológico es importante su identificación y tratamiento.

Tabla 1: Resumen de investigaciones de *Entamoeba histolytica/dispar* en varias regiones del mundo

Autor	Año publicación	Región	n	Microscopía	Cultivo	Isoenzimas		PCR		ELISA		Referencia
				Fresco/ concentración	%	<i>E.histolytica</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica/dispar</i>	<i>E.histolytica</i>	
López O. et al	2012	Colombia	100*	8				1	5	1	0	30
Pereira et al	2014	Brasil	1403	5.7						15.7	3.1	22
Silva MTN et al	2014	Brasil	1195	46.27							0	31
Carneiro S et al	2104	Brasil	97	25	50**			0	25**		8.3**	32
Rivero Z et al	2009	Venezuela	204	20.58				10.78	7.84			18
Mora et al	2008	Venezuela	428	20.09				6.3	4.4			33
Hooshyar H. et al	2004	Norte, centro y sudeste Irán	16,592	1.36				7.9 ^ψ	92.1 ^ψ			10
Pestehchian N et al	2011	Irán (Sudoeste)	655	1.7				1.5 ^ψ	0.2 ^ψ			19
Haque et al	1998	Bangladesh	98	7			53	28	46		45	9
Yildirim D et al	2014	Turquía	259	6.2							25.1	35
Calderaro et al	2006	Italia	8886	0.82				0.04	0.77			34
Nesbitt et al	2004	Tanzania	842	8.7					8.2	0.8	7.4	23
Blessmann et al	2002	Vietnam y Sudáfrica	491	9.2				9.4	4.9			24
Haque et al	2009	Bangladesh	3646	-				2.1			2.1	36
Shahrul Anuar et al	2012	Malasia	150	8.7								38
Shahrul Anuar et al	2012	Malasia	139	29.5								38
Shahrul Anuar et al	2012	Malasia	211	18.5								38
Zulhainan Hamzah et al	2010	Tailandia	35	35				11.4	80			37

* reportadas como positivas para el complejo *E. histolytica/dispar*

** con relación al 25% de positivas por microscopía

^ψ Se hizo PCR solo en las muestras positivas por microscopía^{ψψ} Se hizo PCR solo en los cultivos positivos

Tabla 2: Datos de área de estudio y muestreo

Región	T °C	Precipitación	Periodo año 2012 (mes)	Población	Total de	Casos	Controles
		pluvial acumulada mm			muestras n		
Guamaní	12.3	159.2	marzo a mayo	62065	206	100	100
Borbón	26	16.5	julio y agosto	7696	146	39	107
Total					346	139	207

Tabla 3: Mezcla de reacción para PCR

	Condiciones requeridas	Concentraciones Stock	Volumen por reacción (RX)
Buffer Go Taq	1X	5X	4.0 uL
MgCl ₂	2.5 mM	25mM	2.0 uL
Primer 1*	1 uM	10 uM	2.0 uL
Primer 2*	1 uM	10 uM	2.0 uL
dNTPs	0,2mM	1mM	4.0 uL
Taq	1U	5U/uL	0.2 uL
AND muestra			2.0 uL
Agua			3.8 uL

*Los primers son específicos para cada especie de Entamoeba^{2,18}

gen SRPEd *E. dispar*: fragmento de 567 pb
 sense: GTA GTT CAT CAA ACA CAG GTG A
 antisense: CAA TAG CCA TAA TGA AAG CAA
 gen SRPEh *E. histolytica*: fragmento de 553 pb
 sense: CTT GAA AAG CTT GAA GAA GCT G
 antisense: AAC AAT GAA TGG ACT TGA TGC A

Tabla 4: *E.histolytica/E.dispar* por PCR y microscopía. Sensibilidad y especificidad del método microscópico con relación al PCR

	Resultados por PCR*				Resultados por Microscopía				Sensibilidad		Especificidad	
	Guamaní		Borbón		Guamaní		Borbón		Guamaní	Borbón	Guamaní	Borbón
	n	%	n	%	n	%	n	%	%	%	%	%
<i>E. histolytica/dispar</i>	58	29	26	17.8	5	2.6	21	14.4	51.3	55.3	98.6	88.2
Negativo	142	71	120	82.2	195	97.4	125	85.6				
Total	200	100	146	100	200	100	146	100				

* Se asume la PCR como prueba de referencia

Tabla 5: Frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en las dos comunidades.

	Guamaní		Borbón	
	n	%	n	%
<i>E. histolytica</i>	26	13	5	3.4
<i>E. dispar</i>	32	16	21	14.4
Negativo	142	71	120	82.2
Total	200	100	146	100
<i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> *	7	3.5	0	0

*Ya consideradas en los totales de cada especie de Entamoeba

Tabla 6: Riesgo Caso vs. Control

	Positivo <i>E. histolytica</i>	
	Guamaní	Borbón
Caso	17	3
Control	9	2
Total	26	5
OR	2.07 (0.87 - 4.89)	4.37 (0.70 - 7.24)

Tabla 7: Resumen de investigaciones sobre *E. histolytica*/*E. dispar* en Ecuador

Autor	Año publicación	Región	Provincia	Microscopía		Cultivo	Isoenzimas		PCR		ELISA		Referencia
				Fresco/concentración			<i>E.histolytica</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica/E.dispar</i>		
				n	%		%	%	%	%	%	%	
Weige M et al	1996	Quito	Pichincha	91	88								25
Gatti et al	2002	Borbón	Esmeraldas	178	27	50**	18.9	70.3			68.2	9	8
Levecke V. et al	2011	Loja	Loja	674	16.2				0	22.8*			21
Jacobsen K. et al	2007	Zonas rurales	Chimborazo	293	57.1								26
Guderian et al	1987	Quito	Pichincha	100	1								29
		Santa											
Rinne S et al	2005	Ana	Cuenca	200	46.6								27
Cho SY et al	1990	Palmar	Guayas	325	19.4								28
Mejía R et al	2013	Quinindé	Esmeraldas	400	1.5					1			20

* Se hizo PCR solo en las muestras positivas por microscopía

** Del total n

REFERENCIAS

1. Walsh Julia, 1986. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Reviews of Infectious Diseases*, Vol. 8, No. 2: 228-238.
2. Fotedar, R., D. Stark, N. Beebe, D. Marriott, J. Ellis, y J. Harkness, 2007. Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2007, 511-532. doi:10.1128/CMR.00004-07.
3. Murray P, Rosenthal Ken, Pfaller Michael, 2007. *Microbiología médica*, Madrid: Elsevier España S.A., 847 – 850
4. World Health Organization, 1997. World Health organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis
5. Uribrren T, 2015, Entamoebosis o Amibiasis o Amebiasis, disponible desde <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>, Universidad Autónoma de México
6. Parija S, Mandal J, and Ponnambath D, 2014. Laboratory methods of identification of Entamoeba histolytica and its differentiation from lool alike Entamoeba spp. *Tropical parasitology journal*, Jul-Dec;4(2):90-95
7. Tanyuskse, M., Petri W, 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*: 713–729
8. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo, Bruno A, Maserati R, Bisoffi Z, Scaglia M, 2002, Infecciones amebianas debidas al complejo Entamoeba Histolytica – Entamoeba dispar: Un estudio de la incidencia en una remota área rural de Ecuador, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
9. Haque R, Ali ik, Akther s, Petri w Jr. Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of Entamoeba histolytica Infection, 1998, *Journal of Clinical Microbiology*, p. 449–52 vol. 36, no. 2
10. HooshyarH, RezaianM, KazemiB, Jeddi-Tehrani M, Solaymani-Mohammadi S. 2004, The distribution of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in northern, central, and southern Iran, *Parasitol Res* 94:96-100
11. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Enfermedades diarreicas, disponible en internet desde <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>, abril 2013.
12. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010. Censo de Población y Vivienda 2010. Disponible en : www.ecuadorencifras.com.

13. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2012. Boletín Meteorológico Año XXXVII No. 444 Mes Marzo 2012.
14. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2012. Boletín Meteorológico Año XXXVII No. 445 Mes Abril 2012.
15. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2012. Boletín Meteorológico Año XXXVII No. 446 Mes Mayo 2012.
16. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2012. Boletín Meteorológico Año XXXVII No. 448 Mes Julio 2012.
17. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2012. Boletín Meteorológico Año XXXVII No. 449 Mes Agosto 2012.
18. Rivero Z. et al, 2009, Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by polimerasa chain reaction in a community in Zulia State, Venezuela, *Cad. Saude Pública, Río de Janeiro*, 25(1):151-159.
19. Pestehchian N, Nazary M, Haghighi A, Salehi M, Yosefi H, 2011, Frequency of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* prevalence among patients with gastrointestinal complaints in Chelgerd city, southwest of Iran, *Journal of Research in Medical Sciences*, 16(11): 1436-1440
20. Mejía R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper P, Nutman T, 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, *Tropical Medicine and Hygiene* Jun 5; 88(6):1041-1047
21. Levecke B, Dreesen L, Barronuevo-Samaniego M, Benitez W, Praet N, Brandt J, Dorny P, 2011, Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. In a rural community of Loja province, South Ecuador, *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105(2011)737-739
22. Pereira VV, Conceição Ada S, Maximiano LH, Belligoli Lde Q, Silva ES, 2014, Laboratory diagnosis of amebiasis in a sample of students from southeastern Brazil and a comparison of microscopy with enzyme-linked immunosorbent assay for screening of infections with *Entamoeba* sp. *Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical* 2014 Jan-Feb;47(1):52-6. doi: 10.1590/0037-8682-0214-2013
23. Nesbitt R, Mosha FW, Katki H, Ashraf M, Assenga C, Lee, Amebiasis and Comparison of Microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*, 2004 *Journal of the National Medical Association* vol. 96, no. 5, 671
24. Blessmann J, Buss H, Ton P, Dinh B, Viet Ngo Q, Le Van A, Abd Alla M, Jackson T, Ravdin J, Tannich E. 2002, Real-Time PCR for Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica*

and *Entamoeba dispar* in Fecal Samples, *Journal of clinic Microbiology*, Dec.2002, p. 4413-4417

25. M.M. Weigel A. Calle, R.X. Armijos, I.P. Vega, B.V. Bayas, C.E. Montenegro, 1995, The effect of chronic intestinal parasitic infection on maternal and perinatal outcome, *International Journal of Gynecology Obstetrics*.
26. Jacobsen K, Ribeiro P, Quist B, Rydbeck B, 2007, Prevalence of Intestinal Parasites in Young Quichua Children in the Highlands of Rural Ecuador, *J HEALTH POPUL NUTR* 2007 Dec 25(4):399-405 ISSN 1606-0997
27. Rinne S, Rodas EJ, Galer-Unti R, Glickman N, Glickman LT, Prevalence and risk factors for protozoan and nematode infections among children in an Ecuador Highland community, 2005, *Tropical Medicine and Hygiene*, Aug;99(8):585-592
28. Cho SY, Kim JH, Park SH, 1990, Status or intestinal parasite infections in inhabitants of Palmar, Guayas Province, Ecuador, *The Korean journal of parasitology* Jun;28(2):109-13
29. Guderian R, Ordoñez G, Bozano R, 1987, *Diarrea Aguda Asociada a Campylobacter y otros Agentes Patógenos en Quito, Ecuador. Bol Oficina Sanit Panam* 102:333-339.
30. López O, López M, Corredor V, Echeverri M, Pinilla A, 2012, Differentiation of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* using Gal/GalNAc-lectin and polymerase chain in Colombian isolates reaction, *Rev Med Chile*, 140: 476-483
31. Silva MTN, Santana JV, Bragagnoli G, Marinho AMN y Malagueño E, 2014, Prevalence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in the city of Campina Grande, in Northeastern Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(5):451-454, September-October, 2014 doi: 10.1590/S0036-46652014000500015
32. Carneiro Santos H, Fernandes Martins L, Saramago Peralta R, Peralta J, Werneck de Macedo H, 2014, Frequency of amoebiasis and other intestinal parasitoses in a settlement in Ilhéus City, State of Bahia, Brazil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014 Jan-Feb;47(1):101-4 doi.org/10.1590/0037-8682-0078-2012.
33. Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H, 2008, Estudio Epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela, *Invest Clin* 49(2):225-237,2008
34. Calderaro A, Gorrini C, bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C, 2006, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(5):450-457

35. Yıldırım D , Hasbek M, Nur N, 2014, Analysis of Intestinal Ameobiasis in Patients with Diarrhea by Adhesin Antigen Test and Direct Microscopy, Turkish Journal of Parasitology; 38: 155-8.
36. Haque R, Mondal D, Karim A, Hossain Molla I, Rahim A, Faruque A, Ahmad N,. Kirkpatrick B, Houpt E, Snider C, Petri WJr., 2009. Prospective Case-Control Study of the Association between Common Enteric Protozoal Parasites and Diarrhea in Bangladesh. National Institutes of Health Clin Infect Dis. May 1; 48(9): 1191–1197. doi:10.1086/597580.
37. Zulhainan H, Songsak P , Mathirut M , Saovanee L and Porntip Ch P, 2010, Development of Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Entamoeba histolytica* , *Entamoeba dispar* ,and *Entamoeba moshkovskii* in Clinical Specimens, Am. J. Trop. Med. Hyg., 83(4), pp. 909–913, doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0050
38. Tengku Shahrul Anuar, Hesham M. Al-Mekhlafi, Mohamed Kamel Abdul Ghani, Siti Nor Azreen, Fatmah Md Salleh, Nuraffini Ghazali, Mekadina Bernadus and Norhayati Moktar, 2013, Different Clinical Outcomes of *Entamoeba histolytica* in Malaysia: Does Genetic Diversity Exist? Korean J Parasitol Vol. 51, No. 2: 231-236, doi.org/10.3347/kjp.2013.51.2.231