
Estudio epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Leonor Mora^{1,2}, Ana García¹, Marcos De Donato³ y Haideé Urdaneta⁴

¹Postgrado de Biología Aplicada, ²Departamento de Bioanálisis,

³Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA),
Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela e

⁴Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Palabras clave: *E. histolytica*, *E. dispar*, diagnóstico molecular, amibiasis.

Resumen. Se realizó un estudio epidemiológico y molecular de cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* en 428 pacientes con sintomatología gastrointestinal de diarrea, de distintos centros de salud en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Las muestras se procesaron a través de: examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y coloración temporal de lugol, coloración tricrómica y método de concentración de Ritchie, y para el asilamiento de quistes, se usó el gradiente de sacarosa. Para la detección molecular, se amplificó la subunidad pequeña de ARN 16S por Nested-Multiplex PCR. La prevalencia de *E. histolytica*/*E. dispar* por el método directo fue de 20,09%, mientras que por Ritchie se obtuvo un 13,79% y con coloración tricrómico un 12,15%. Por PCR la prevalencia para *E. histolytica* fue de 6,31% y de *E. dispar* de 4,44%, detectándose cuatro casos de infecciones mixtas. La secuenciación de los fragmentos amplificados de *E. histolytica* indicó un 100% de homología con las secuencias de cepas de Mérida (Venezuela), Estados Unidos, Brasil, México y del GenBank. Las infecciones por *E. histolytica* y *E. dispar* estuvieron asociadas estadísticamente con la edad, pero no con el sexo. La presencia de sangre, moco y dolor abdominal resultaron asociadas sólo en los infectados con *E. histolytica*. La moderada prevalencia de *E. histolytica* indica su carácter endémico en esta población y advierte sobre el potencial problema como factor de morbilidad y mortalidad en el estado Sucre. La frecuencia de *E. dispar* en esta población hace presumir que existe una sobrestimación en el diagnóstico de amibiasis con sus implicaciones clínicas y epidemiológicas y demuestra el poco conocimiento sobre las prevalencias reales de este protozooario. La PCR permitió la identificación diferencial de *E. histoly-*

tica y *E. dispar*, así como la presencia de infecciones mixtas, por lo cual es una herramienta indispensable para estudios epidemiológicos de amebiasis.

Epidemiologic and molecular study of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* strains in patients with diarrhea in Cumana, Sucre state, Venezuela.

Invest Clin 2008; 49(2): 225 - 237

Key words: *E. histolytica*, *E. dispar*, molecular diagnosis, amebiasis.

Abstract. An epidemiological and molecular study on *E. histolytica* and *E. dispar* was carried out in 428 patients with gastrointestinal symptomatology of diarrhea from different health centers in Cumana, Sucre state. The samples were processed through: direct examination with 0.85% physiological saline solution, temporal lugol staining, trichromic staining and the Ritchie method of concentration; a sucrose gradient was used for cyst isolation. The small subunit of the 16S RNA was amplified by nested, multiplex PCR for the molecular detection. The *E. histolytica*/*E. dispar* prevalences according to the direct, Ritchie and trichromic staining methods were 20.09, 13.79 and 12.15%, respectively; while prevalences according to PCR for *E. histolytica* and *E. dispar* were 6.31% and 4.44%, respectively, also detecting four cases of mixed infection. Sequencing of the amplified fragments of *E. histolytica* showed 100% homology with the sequences with strains from Merida (Venezuela), USA, Brazil, Mexico and GenBank. The infections by *E. histolytica* and *E. dispar* were statistically associated with age but not with sex. The presence of mucus, blood and abdominal pain were only associated to *E. histolytica* infection. The moderate prevalence of *E. histolytica* shows the endemic status of this population and warns about the potential problem as a morbidity and mortality in Sucre state. The frequency of *E. dispar* in this population suggests the existence of an overestimation problem in the diagnosis of amoebiasis with its clinical and epidemiological implications, and shows the poor knowledge about the true prevalences of this protozoan. The PCR allowed for the differential identification of *E. histolytica* and *E. dispar*, as well as the presence of mixed infections, making a great tool for epidemiological amoebiasis studies.

Recibido: 17-11-2006. Aceptado: 15-11-2007.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el protozooario patógeno causante de la infección invasiva intestinal y extraintestinal denominada amebiasis, afección cosmopolita que tiene

especial incidencia en los países tropicales y subtropicales (1, 2).

La aparición de una especie amebica no patógena (*Entamoeba dispar*), descrita por Brumpt 1925, indistinguible morfológicamente a *E. histolytica* ha tenido implica-

ciones importantes en la epidemiología de la amibiasis (3, 4). Diversas investigaciones epidemiológicas en diferentes regiones del mundo han señalado a *E. dispar* como la especie más prevalente, en su mayoría observada en individuos asintomáticos. Sin embargo en países como México, India y África, *E. histolytica* se ha registrado con mayores porcentajes de morbilidad y mortalidad (5-8). El diagnóstico de estas especies es de gran interés clínico, debido a que, excepto en el caso de la observación microscópica de trofozoítos hematófagos en cuadros diarreicos, es posible diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar* (9).

Se han establecido diferencias entre ambas especies en cuanto a los caracteres bioquímicos, inmunológicos, genéticos y clínicos de cada una de ellas (10-14). Dentro de los caracteres bioquímicos, existen diferentes isoenzimas entre *E. histolytica* y *E. dispar*, las cuales se identificaron a través de migración electroforética de enzimas como: hexoquinasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa, peptidasa y NADP-diaforasa (10, 11). Inmunológicamente, se han encontrado diferencias de *E. dispar* con *E. histolytica* en cuanto a proteínas como: lectina de adherencia galactosa N-acetil galactosamina (Gal/ GalNAc), antígenos de superficie 96KDa, 29KDa/ 30KDa y gránulos electrodensos (EDG) involucrados en la actividad colagenolítica de *E. histolytica* (12).

Los estudios genéticos constituyeron la base de la diferenciación de estas especies a través de la caracterización de sondas de ADN, denominadas P145 y B133, procedentes de moléculas circulantes de ADN cromosomal de cepas patógenas y no patógenas, métodos de clonación, enzimas de restricción, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), métodos que permitieron observar diferencias entre las secuencias de aminoácidos entre los antígenos de 29-30KD, en los aislamientos patógenos y no patógenos, así como también en los en-

sayos a nivel de los ARN ribosomales conservados filogenéticamente (13).

Las limitaciones del examen microscópico, específicamente los falsos diagnósticos de amibiasis asociados al mismo y su insuficiencia para discriminar entre infección por *E. histolytica* y *E. dispar*, han conducido al desarrollo de procedimientos que permitan la detección de componentes de las especies presentes (14). Los estudios de ADN y el desarrollo de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa, ha permitido la diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, resultando de gran utilidad para estudios epidemiológicos y, donde no hayan podido ser identificadas al aplicar las pruebas convencionales, así como también la detecciones de infecciones mixtas de *E. histolytica* y *E. dispar* (15). Los métodos desarrollados sobre la base de PCR especie-específica, son actualmente utilizados como la prueba estándar de oro, reemplazando la diferenciación de especies por cultivos y análisis de isoenzimas (16).

En tal sentido, se planteó en esta investigación hacer un estudio epidemiológico y molecular de cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* en pacientes con diarrea, constituyendo éste el primer trabajo que aporta información sobre la presencia de estas especies en la población del estado Sucre, Venezuela.

POBLACIÓN Y MÉTODOS

Se seleccionaron pacientes con síndrome de diarrea, sin distinción de edad ni sexo, en un lapso comprendido entre agosto de 2003 a septiembre de 2004, que acudieron a los laboratorios del Hospital "Antonio Patricio de Alcalá" y los ambulatorios: Dr. "Arquímedes Fuentes Serrano", "Dr. Bernardino Martínez" y "Brasil", en la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. A cada uno de los pacientes se le aplicó una encuesta para obtener información sobre

datos personales y clínicos, cumpliendo con parámetros establecidos en la declaración de Helsinki del 2000. Se excluyeron para este estudio pacientes que recibieron medicamentos antiprotozoarios y antihelmínticos por lo menos 2 meses antes de la colecta de la muestras de heces.

Una vez obtenidas las muestras de heces en envases adecuados, fueron trasladadas y procesadas de inmediato en el laboratorio de Parasitología del Departamento de Bioanálisis para su procesamiento microscópico, y al laboratorio de Genética del Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, para el análisis molecular.

Procesamiento de las muestras

Exámenes microscópicos. Examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y coloración temporal de lugól, coloración tricrómica para la observación de la morfología nuclear de las especies en estudio, y el método de concentración de Ritchie (1).

El gradiente de densidad (sacarosa) se utilizó para la separación de quistes según la metodología propuesta por Jyothi y col. (17). Previamente las muestras se lavaron con solución buffer PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) a una concentración 1X, con el fin de eliminar la mayor cantidad de detritus fecales; para ello se tomó aproximadamente 1g de la muestra y se colocó en tubos Falcon de 15 mL de capacidad con 3 mL de PBS 1X. Se mezcló en vortex, se centrifugó a 3500 g a temperatura ambiente por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó PBS 1X nuevamente, repitiendo el lavado dos veces más. Se resuspendió en PBS 1x (300 µL) hasta su procesamiento por gradiente de densidad de sacarosa. En la estandarización se prepararon y probaron varias concentraciones de sacarosa: 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4 y 3,0

mol/L, obteniéndose como concentración óptima la de 2 y 3 mol/L.

Extracción de ADN. El aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de los quistes de las amibas se realizó utilizando un kit de extracción Wizard Genomic® de Promega (Madison, Wisconsin, EUA). El ADN se almacenó -20°C, hasta su posterior uso para la PCR (18,19).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo por Nested-Multiplex PCR siguiendo el protocolo de Evangelopoulos y col. (19), donde se amplificó primero un fragmento de ADN ribosomal (ADNr) común de 1076 pb para ambas especies con cebadores externos E1 (TGC TGT GAT TAA AAC GCT) y E2 (TTA ACT ATT TCA ATC TCG G) y posteriormente se utilizaron cebadores específicos para *E. histolytica* Eh-L (ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A) y Eh-R (CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT) para amplificar un fragmento de 427-pb, mientras que los cebadores internos específicos para *E. dispar* correspondieron a Ed-L (GTT AGT TAT ATA ATT TCG ATT AGA A) y Ed-R (ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC) los cuales amplificaron un fragmento de 195pb.

Para la estandarización de la PCR se usó ADN de seis cepas controles para *E. histolytica*, cepa (CSP) y (ICB-32) procedentes de Brasil obtenida de individuos con amibiasis asintomática; cepa IULA: 0593:2 (NER) procedente de Mérida-Venezuela; IULA:1092:1 (MMM) procedente de área endémica de Mérida-Venezuela; HMI-IMSS cepa Mexicana considerada como referencia Internacional; HK9-NIH cepa de Estados Unidos de América, todas mantenidas en medios de cultivo axénicos TYI- S-33 mediante repiques durante la fase de crecimiento exponencial (cada 72 horas) donadas por el Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de los Andes.

Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis (Sistema de

electroforesis en gel EC330 Minicell Primo) utilizando gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) como colorante.

Secuenciación. Se seleccionaron 10 muestras, 4 muestras escogidas al azar que amplificaron para *E. histolytica* (UDO) y 6 amplificados de los cultivos axénicos (cepas controles) utilizadas como referencia.

Los productos amplificados de *E. histolytica*, además de las cepas de referencias nacionales e internacionales fueron purificados empleando el kit comercial Concert™ Acid Purification System, (Life Technologies CONCERT, Gibco®-BRL), y enviadas siguiendo las recomendaciones ofrecidas por el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), donde se procedió a realizar la secuenciación con un secuenciador automático (ABI PRISM 377) y el kits Big Dye Terminator.

Análisis estadístico. Se utilizaron formulas de prevalencia para comparar las especies parasitarias con base en sus frecuencias de aparición y abundancia relativa en las muestras; para las asociaciones de las variables clínicas y epidemiológicas se utilizó Ji- cuadrado (χ^2) (20). Las secuencias se analizaron por el programa computarizado

de Cromas software, version 1.45 School of Health Sciences, Griffith University, Southport, Queensland Australia (21) y el Clustal X Windows (22).

RESULTADOS

Se analizaron un total de 428 muestras de heces obteniéndose por el método directo 86 casos de pacientes parasitados por el complejo *E. histolytica*/*E. dispar* representando un 20,09% de prevalencia, mientras que por el método de concentración de Ritchie se identificaron 59 casos (13,79%), y por coloración tricrómica 52 casos (12,15%). En la mayoría de las muestras fecales, se observó la presencia de quistes. Sólo se evidenció la presencia de trofozoítos hematófagos característicos de infección por *E. histolytica* en cuatro muestras disintéricas. También fueron identificados otros parásitos al examen directo, siendo los protozoarios más frecuentes: *Blastocystis hominis* (22,89%), *Entamoeba coli* (10,28%), *Endolimax nana* (8,64%) y *Giardia duodenalis* (6,31%) y los helmintos: *Ascaris lumbricoides* (4,44%) y *Trichuris trichiura* (3,74%) (Fig. 1).

Al aplicar la PCR, se obtuvieron 42 muestras que amplificaron un producto de

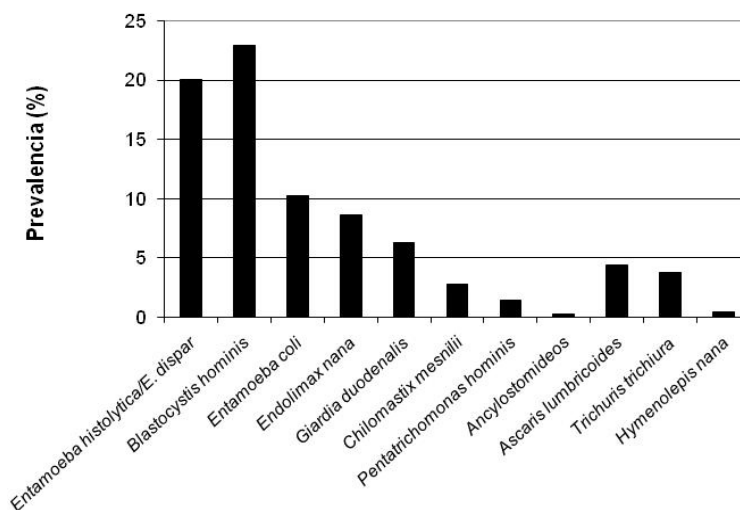


Fig. 1. Prevalencia de protozoarios y helmintos encontrados en los pacientes estudiados, según el examen directo de las heces.

1076 pares de bases (pb) lo que permitió la identificación de *E. histolytica* y *E. dispar* al compararlos con el control positivo de *E. histolytica* (MMM). En la segunda fase de PCR, se obtuvo amplificación exclusivamente para el fragmento de *E. histolytica* en 23 muestras, en 15 amplificó sólo el fragmento específico de *E. dispar*, y en 4 muestras amplificaron ambos fragmentos (Fig. 2). De acuerdo con estos resultados, la prevalencia de *E. histolytica* fue de 6,31% y de 4,44% para *E. dispar*.

Tomando en consideración los resultados de la PCR, se encontró asociación entre la edad y la presencia de *E. histolytica* ($\chi^2=7,33^*$; $p < 0,05$), así como también con *E. dispar* ($\chi^2=10,29^*$; $p < 0,05$), (Fig. 3). No

se encontró asociación con el sexo para ninguna de las especies de *Entamoeba* ($\chi^2=2,87$; $p > 0,05$; $\chi^2=0,43$; $p > 0,05$, respectivamente).

Al relacionar los signos y síntomas de los pacientes infectados con *E. histolytica*, resultaron asociados significativamente con la presencia de moco, sangre y dolor abdominal (Tabla I). En los pacientes infectados con *E. dispar* no se encontró asociación significativa con ningún signo o síntoma (Tabla I). En los pacientes infectados con *E. histolytica* se observaron coinfecciones con diversos protozoarios donde la mayor frecuencia correspondió a *B. hominis*, sin embargo, sólo se encontró asociación estadística significativa con *G. duodenalis*

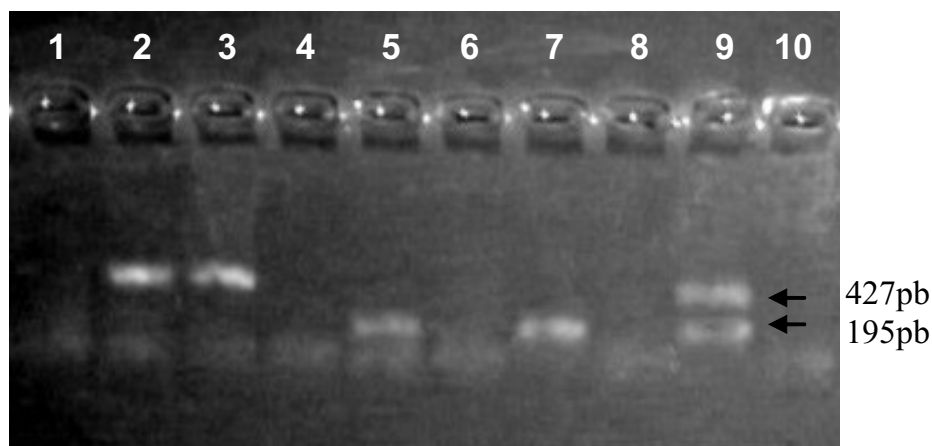


Fig. 2. Fragmentos específicos de 427 pb correspondiente a *E. histolytica* y de 195 pb para *E. dispar*, en gel de agarosa al 2%.

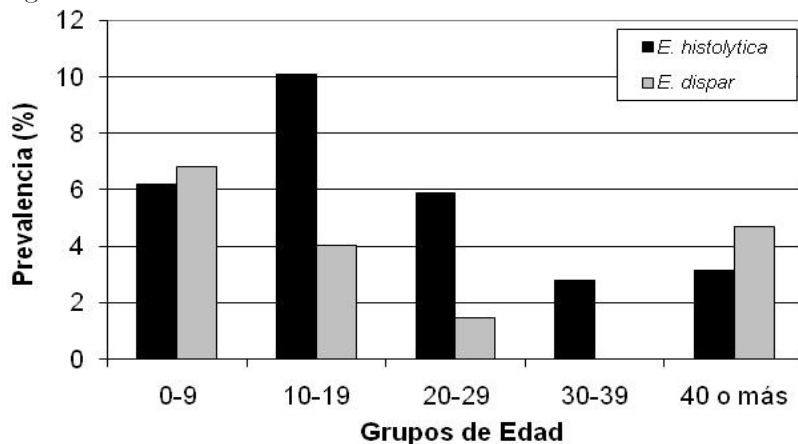


Fig. 3. Frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* según los grupos de edades de los pacientes estudiados.

TABLA I
ASOCIACIÓN DE *Entamoeba histolytica* Y *Entamoeba dispar* CON LAS VARIABLES CLÍNICAS EVALUADAS EN LOS PACIENTES DE ESTUDIO

Variables clínicas	Infectados por <i>E. histolytica</i>	Frecuencia (%)	Infectados por <i>E. dispar</i>	Frecuencia (%)
Moco	16*	59,26	6	31,58
Sangre	17**	62,96	6	31,58
Vómitos	5	18,52	4	21,05
Náuseas	9	33,33	7	36,84
Dolor abdominal	24*	88,88	11	57,89
Fiebre	6	22,22	6	31,58
Flatulencia	18	66,67	13	68,42

Asociación: *Significativa. ** Muy significativa.

($\chi^2=7,27^*$; $p < 0,05$), *E. dispar* ($\chi^2=7,31^*$; $p < 0,05$), y muy significativa con *Pentatrichomonas hominis* ($\chi^2=19,65^{**}$; $p < 0,01$) (Tabla II).

La secuenciación del fragmento de 427 pares de bases específico para *E. histolytica* amplificado a partir de las muestras obtenidas en este estudio (UDO-71, UDO-144, UDO-404 y UDO-425), así como la de referencia Nacional (ULA-MMM y ULA-NER) e internacional (ICB-32, CSP, IMSS-HMI y NIH-HK9) mostraron una completa conservación de la secuencia (Fig. 4), con excepción de un cambio A→T observado en la cepa de Brasil (CSP) y la cepa de México (IMSS-HMI), en una posición muy cercana al punto alineación del primer derecho (396 nucleótidos).

DISCUSIÓN

En la población estudiada se observó que la prevalencia del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* varió de acuerdo a la técnica aplicada, reflejando a través del examen directo el mayor porcentaje con respecto al método de concentración de Ritchie y de la coloración trierómica, lo cual confirma una aparente endemicidad de estas especies en la población. El examen directo es utilizado

TABLA II
Entamoeba histolytica Y SU ASOCIACIÓN CON PROTOZOARIOS Y HELMINTOS DETECTADOS EN LOS PACIENTES EN ESTUDIO

Parásitos intestinales	Co-infectado con <i>E. histolytica</i>	No co-infectado con <i>E. histolytica</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	10	17
<i>Giardia duodenalis</i>	5*	22
<i>Endolimax nana</i>	5	22
<i>Entamoeba coli</i>	4	23
<i>Entamoeba dispar</i>	4*	23
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	3**	24
<i>Chilomaxti mesnili</i>	1	26
<i>Trichuris trichiura</i>	2	25
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	26
<i>Anquilostomideo</i>	0	27
<i>Hymenolepis nana</i>	0	27

Asociación: *Significativa. **Muy significativa.

ampliamente para la identificación de la mayoría de los parásitos intestinales, por su fácil realización y economía, sin embargo en el hallazgo de *E. histolytica*, conlleva a falsos positivos, debido a que la especie

```

UDO-71 (muestra)      AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
UDO-144 (muestra)    AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
UDO-404 (muestra)    AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
UDO-425 (muestra)    AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
IULA-MMM (Mérida)    AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
IULA-NER (Mérida)    AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
ICB-32 (Brasil)      AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
CPS (Brasil)         AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
IMSS-HMI (México)   AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
NIH-HK9 (USA)        AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
X56991 (GenBank)     AAGTTTCTAGAAATGTTAAATAAAAACAAGAAGGAAACAATTCAGTAATTGAGTTGTTATTACTTTG
*****

UDO-71      AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
UDO-144     AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
UDO-404     AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
UDO-425     AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
IULA-MMM    AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
IULA-NER    AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
ICB-32     AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
CPS        AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
IMSS-HMI   AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
NIH-HK9    AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
X56991     AATAAAATAAGGTGTTTAAAGCAAACATTATGTTAATGAATATTCAGCATGGGACAATGCTGAGGGGATGTCATAAAG
*****

UDO-71      ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
UDO-144     ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
UDO-404     ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
UDO-425     ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
IULA-MMM    ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
IULA-NER    ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
ICB-32     ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
CPS        ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
IMSS-HMI   ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
NIH-HK9    ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
X56991     ACATTCGAGAGAAGGATTTAAAGGAACAATTTGGGGTGATTTCAGAAAATAACGGGAGAGGTGAAAATCCATGATCGCTAT
*****

UDO-71      AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
UDO-144     AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
UDO-404     AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
UDO-425     AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
IULA-MMM    AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
IULA-NER    AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
ICB-32     AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
CPS        AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
IMSS-HMI   AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
NIH-HK9    AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
X56991     AAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACCTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
*****

UDO-71      ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
UDO-144     ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
UDO-404     ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
UDO-425     ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
IULA-MMM    ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
IULA-NER    ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
ICB-32     ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
CPS        ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
IMSS-HMI   ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
NIH-HK9    ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
X56991     ATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAAAGAT
*****

```

Fig. 4. Secuencia del fragmento de 427 pb específico para *E. histolytica* de las muestras: UDO (71, 144, 404, 425) y de Mérida: ULA (MMM, NER), Brasil: ICB (32, CSP), México: IMSS-HMI, EUA: NIH-HK9 y la del GenBank (X56991).

puede confundirse con otras amibas como *E. dispar*, quistes inmaduros de *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmani*, *Entamoeba moshkovskii* u otras células del hospedero como leucocitos y macrófagos, requiriéndose en estos casos de altos niveles de experiencia del analista (23- 27).

Nuestros resultados son consistentes con los señalados en el estado Zulia, Venezuela, en investigación realizada en niños escogidos al azar de 0-14 años, donde se registraron elevadas prevalencias de enteroparásitos señalándose al complejo *E. histolytica*/*E. dispar* con el mayor porcentaje (20,98%) (28). En Nicaragua, un estudio realizado en pacientes mayores de dos años con diarrea provenientes de varios centros hospitalarios, se determinó un 24,00% de prevalencia para el complejo *E. histolytica*/*E. dispar* (23). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los publicados por, Michelli y De Donato (29) quienes indicaron prevalencias inferiores (6%) en individuos sintomáticos y asintomáticos de Río Caribe, estado Sucre.

También fueron observados otros parásitos protozoarios y helmintos a través del examen directo, encontrándose elevadas prevalencias de *B. hominis*, las cuales guardan relación con las obtenidas en otras investigaciones (29-31). La presencia de estas parasitosis en la población pone en evidencia la exposición continua a diferentes enteroparásitos, debido en su mayoría a elementos contaminantes en el ambiente, lo que permite la permanencia y difusión de las formas evolutivas infectantes de los mismos.

Las cifras de prevalencias obtenidas por PCR de *E. histolytica* (6,31%) y *E. dispar* (4,44%) en la presente investigación, demuestran que existe un sobregistro de *E. histolytica* en la población analizada. Estos resultados se asemejan a los reportados por Haque y col. (32) en estudio realizado en niños asintomáticos los cuales, obtuvieron una prevalencia para *E. histolytica*

de 4,7% y de 5% para *E. dispar*. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la presente investigación se demuestra que tanto *E. histolytica* como *E. dispar* pueden encontrarse en igual frecuencia tanto en individuos asintomáticos como sintomáticos. Sin embargo las infecciones asintomáticas por *E. histolytica* deben ser tratadas por su potencial progreso a una enfermedad invasiva (33).

Los resultados obtenidos difieren de los señalados por Parija y Khairnar (24) quienes obtuvieron elevadas prevalencias para *E. dispar* (8,84%) en comparación con la obtenida para *E. histolytica* (1,7%), al evaluar 746 pacientes con síntomas gastrointestinales provenientes de Pondicherry, India. Es importante mencionar que *E. dispar* aún en algunas zonas endémicas de amibiasis, se presenta con mayores porcentajes, representando esto un problema de salud debido a los falsos diagnósticos (5, 23).

La detección por PCR de *E. histolytica* y *E. dispar* constituyó un hallazgo importante ya que demostró que en la población objeto de estudio circulan ambas especies, ya sea en forma individual o en conjunto, evidenciándose *E. histolytica* con más frecuencia que *E. dispar*. El diagnóstico de amibiasis en la mayoría de los laboratorios clínicos del país, es realizado por examen directo y en base a la clínica de los pacientes, lo que ha conllevado a la aplicación de tratamientos inadecuados, sin aplicar el tratamiento adecuado al agente patógeno causante de la diarrea y probablemente ocasionando la alteración de la flora intestinal en estos pacientes. En base a ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (27), sugieren que en el examen microscópico de heces debe reportarse complejo *E. histolytica*/*E. dispar* y que el registro de *E. histolytica* sólo debe emplearse para la especie patógena, identificada por cualquiera de

las técnicas específicas como: análisis de isoenzimas, detección de antígenos fecales, cultivos axénicos, PCR y otras técnicas moleculares.

En cuanto a la edad, los más afectados por ambas especies fueron niños y jóvenes. En estas edades se aumenta el consumo de bebidas y alimentos fuera de sus hogares, así como también está presente el desconocimiento de la transmisión de estas infecciones y fallas en las medidas de prevención que favorecen la presencia de estos enteroparásitos. Estos resultados son consistentes con los señalados en Filipinas (34), donde la mayor prevalencia de *E. histolytica* se obtuvo en el grupo de edades de 5-14 años. En Brasil, Braga y col. (35) reportaron una prevalencia de 24,7% de infectados por *E. histolytica* en 335 individuos con un promedio de edad de 14 años.

Con respecto al sexo, las infecciones por *E. histolytica* y *E. dispar* no mostraron predilección por ningún sexo, lo que indica que ambos tienen la misma susceptibilidad a ser infectados por estas especies, lo cual concuerda con numerosas investigaciones (29, 34, 36).

La observación de las variables clínicas asociadas estadísticamente a *E. histolytica* en la presente investigación son muy indicativas de amibiasis, sin embargo, no debe ser concluyente debido a que existen otros microorganismos, como bacterias y otras especies parasitarias, que pueden ocasionar la aparición de estos signos y síntomas (14). Es importante mencionar que la ausencia de sangre no descarta la presencia de *E. histolytica* en las heces de los pacientes, esta manifestación va a depender de la respuesta del hospedero y de la virulencia de la amiba (1, 14).

La asociación con el dolor abdominal es sustentada con lo reportado por Haque y col. (33) quienes lo señalaron como síntoma frecuente en los pacientes con diarrea asociados a cuadros con *E. histolytica*.

Por otra parte, al referirnos a las asociaciones parasitarias de *E. histolytica* con *P. hominis*, y *E. dispar*, se considera que estas especies pudieran actuar de manera independiente una de la otra (37), debido a que solo *E. histolytica* tiene acción invasiva, mientras que las otras especies son no patógenas, lo cual ha sido previamente señalado en humanos (38). Sin embargo, en la asociación con otros patógenos como *G. duodenalis*, muy probablemente pueda ocurrir una acción competitiva a nivel de la mucosa intestinal. Ambos parásitos pudieran estar causando el cuadro diarreico, quizás uno en mayor grado que el otro, dependiendo de las densidades parasitarias y las interacciones entre los mismos (1).

Los trabajos de Rivera y col. (34) señalan una fuerte asociación del complejo *E. histolytica/E. dispar* con *E. coli*. Así como también los de Acuña-Soto y col. (37) quienes encontraron asociaciones de *E. histolytica* con *E. nana* y *E. coli*.

En lo que respecta a la comparación de las secuencias del fragmento de 427 pb de las cepas de referencia de *E. histolytica* nacionales e internacionales y de las muestras en estudio, se demostró una homología completa (100%) para todas las cepas, con excepción de una cepa de Brasil y la cepa de México. La secuencia de la sub-unidad pequeña del ARN ribosomal, utilizada en este estudio, para el diagnóstico molecular de las especies y la secuenciación, ha sido utilizada para estudios de diferenciación de las especies de *Entamoeba* y *Endolimax*, con muy buenos resultados (39). Es evidente, sin embargo, que esta secuencia no es lo suficientemente variable para poder estudiar las diferencias entre cepas para esta especie. En este sentido, Newton-Sanchez y col. (40), estudiando la secuencia intergénica del ARN ribosomal, la cual es más variable que la sub-unidad pequeña, no encontraron diferencias entre 10 cepas aisladas de *E. histolytica* provenientes de varias partes de México.

Ghosh y col. (41) tampoco pudieron encontrar diferencias significativas entre cepas de México, India y EUA, utilizando la secuencia intergénica entre los genes de la superóxido dismutasa y la actina 3, por lo que sugieren que las infecciones de *E. histolytica* en humanos a nivel mundial se derivan de una sola cepa que se difundió por actividades antropogénicas. Sin embargo, se han encontrado variaciones en el número de repeticiones en los genes de la quitinasa y la proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP, por sus siglas en inglés) que han permitido diferenciar tanto cepas de diferentes regiones como entre cepas de una misma región (42, 43).

En este estudio se demuestra, que existe una sobreestimación de amibiasis en la población analizada, así como también el desconocimiento en cuanto al registro del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*. La PCR resultó ser una técnica adecuada en la identificación de las especies, así como también en la detección de infecciones mixtas. Las cepas en estudio de *E. histolytica* presentaron un 100% de homología con las de referencias. Es evidente que para el diagnóstico de amibiasis es necesario incluir en los laboratorios clínicos, técnicas que permitan distinguir a *E. histolytica* de *E. dispar*, dada la importancia clínica y considerando las consecuencias que ocasionan los inadecuados tratamientos en los pacientes. Se recomienda llevar a cabo nuevas investigaciones epidemiológicas donde se evalúen pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos que permitan esclarecer cifras exactas de prevalencia para ambas especies en la región.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con el financiamiento del Consejo de Investigación N°: CI-5-1001-1277/04, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Los autores expresan su agradecimiento a todos los ambu-

latorios, bioanalistas y pasantes de Bioanálisis por su valiosa colaboración, al Postgrado de Biología Aplicada, al Instituto de Biomedicina de la Universidad de Oriente y al Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de los Andes.

REFERENCIAS

1. **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis Humanas. Corporación para investigaciones Biológicas. 3^{ra} Edición. Medellín, Colombia 1998; 457pp.
2. **Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, Tannieh E.** Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. J Clin Microbiol 2003; 41:4745-4750.
3. **Diamond L, Clark G.** A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (Emended Walker 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Euk Microbiol 1993; 40:340-344.
4. **Jackson T.** *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species, clinical, epidemiological and serological evidence. Int J Parasitol 1998; 28:181-186.
5. **Heckrindorn F, Goran K, Felger P, Vounatsou A, Yapi A, Oettli H, Marti M, Dobler M, Trarore K, Lohourignon L, Lengler C.** Species-specific testing of *Entamoeba* spp. in area of high endemicity. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96:521-528.
6. **Petri W, Haque R, Lyerly D, Vines R.** Estimating the impact of amoebiasis on health. Parasitol Today 2000; 16:320-321.
7. **Urdaneta H, Cova J, Molina S, Aguirre A, Hernández M.** Evaluación inmunológica de cepas de *E. histolytica* venezolanas. Kasma 1998; 26:35-49.
8. **Raj L, Uperof T.** Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. Rev. Latinoam Microbiol 2001; 43:183-187.
9. **Haque R, Ali I, Akther S, Petri J.** Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1999; 36:449-452.

10. **Sargeant P, Williams J, Grene J.** The differentiation of invasive and noninvasive *E. histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-521.
11. **Blanc D.** Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic zymodemes using isoenzyme analysis. *J Protozool* 1992; 39:471-479.
12. **Strachan W, Spice W, Chiodini P, Moody A, Ackers J.** Immunological differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1988; 1(8585):561-563.
13. **Tannich E, Horstmann R, Knobloch J, Arnold H.** Genomic DNA differences between pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5118-5122.
14. **Fonte L.** Amebiasis: Enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. Editorial Elfos Scientiae, La Habana, Cuba. 2000; 193pp.
15. **Katzwinkel W, Loscher T, Rinder H.** Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:115-118.
16. **Tanyukel M, Petri W.** Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:713-729.
17. **Jyothi R, Foerster B, Hamelmann C, Shetty N.** Improved method for the concentration and purification of faecal cysts of *Entamoeba histolytica* for use as antigen. *J Trop Med Hyg* 1993; 96:249-250.
18. **Miller S, Polesky H.** A simple Saltingout Procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
19. **Evangelopoulos G, Spanakos E, Patsoula N, Vakalis.** A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Am Trop Med Parasitol* 2000; 3:233-240.
20. **Sokal R, Rohlf J.** Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 1992; 361pp.
21. **Sommer R, Tautz D.** Minimal homology for PCR primer. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:6749.
22. **Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Leanmougin F, Hignis D.** The Clustal X Windows interface flexible Strategils for multiples sequence alinment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 24:4876-4882.
23. **Byron L, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E.** Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A microscopic, Triage Parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006; 37:529-534.
24. **Parija S, Khairnar K.** *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *J Health Popul Nutr* 2005; 23:292-295.
25. **Moody S, Becker S, Nuchamowitz M, Mirelman D.** The lipophophogycan-like molecules of virulent and avirulent *E. histolytica* as well as of *E. dispar* differ in both composition and abundance. *Arch Med Res* 1997; 114:95-104.
26. **Huston C, Haque R, Petri W.** Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 31:2845-2850.
27. **World Health Organization (WHO).** A consultation with experts on amoebiasis. *Epidem Bull PAHO* 1997; 18:13-14.
28. **Díaz I, Rivero Z, Bracho A, Castellanos M, Acurero E, Calchi L, Atencio R.** Prevalencia de enteroparásitos en niños de la etnia Yukpa de Toromo, estado Zulia, Venezuela. *Rev Med Chile* 2006; 134:72-78.
29. **Michelli E, De Donato M.** Prevalencia de *Blastocystis hominis* en habitantes de Río Caribe, estado Sucre, Venezuela. *Saber* 2001; 2:105-112.
30. **Devera R, Cermeño J, Blanco Y, Bello M, Guerra X, De Sousa M, Maitam E.** Prevalencia de Blastocistocis y otras parasitosis intestinales en una comunidad rural del estado Anzoátegui, Venezuela. *Parasitol Latinoam* 2003; 58:95-100.
31. **Barahona L, Maguiña C, Náquira C, Terashima A, Tello R.** Sintomatología y fac-

- tores epidemiológicos asociados al parasitismo por *Blastocystis hominis*. Parasitol Latinoam 2002; 57:96-102.
32. **Haque R, Ali M, Petri W.** Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 1031-1034.
 33. **Haque R, Hustor C, Hughes M, Houtp E, Petri W.** Amebiasis. N Engl J Med 2003; 348:1565-1573.
 34. **Rivera W, Tachibana H, Kambara H.** Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:916-921.
 35. **Braga L, Mendoca C, Paiva S, Sales A, Cavalcante A, Mann J.** Seropositivity for an intestinal infection with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. J Clin Microbiol 1998; 36:3044-3045.
 36. **Gathiram V, Jackson T.** A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. S Afric Med J 2001; 72:669-672.
 37. **Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F, Schoolnick G.** Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 58-70.
 38. **Espinoza-Castellano M, Martínez-Palomo A.** Pathogenesis of Intestinal amebiasis: From molecules to Disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13:318-331.
 39. **Silberman J, Clark G, Diamond L, Sogin M.** Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-Subunit Ribosomal RNA sequences. Mol Biol Evol 1999; 16:1740-1751.
 40. **Newton-Sánchez OA, Sturm-Ramirez K, Romero-Zamora JL, Santos-Preciano JI, Samuelson J.** High rate of occult infection with *Entamoeba histolytica* among non-dysenteric Mexican children. Arch Med Res 1997; 28: 311-313.
 41. **Ghosh S, Frisardi M, Ramirez L, Descoteaux S, Sturm K, Newton O, Santos J, Ganguly C, Lohia A, Reed S, Samuelson J.** Molecular Epidemiology of *Entamoeba* spp. Evidence of a Bottleneck (Demographic Sweep) and Transcontinental Spread of Diploid Parasites. J Clin Microbiol 2000; 10:3815-3821.
 42. **Zaki M, Clark C.** Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2001; 39:897-905.
 43. **Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozakil T.** Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. J Clin Microbiol 2002; 11:4081-4090.