

Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos.

Leonor Chacín-Bonilla.

Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, amibiasis.

Resumen. La historia de *Entamoeba histolytica* es muy confusa y muestra diversos conceptos erróneos acerca del parásito y su relación con el hospedador. La poca correlación entre la prevalencia de la amibiasis asintomática y sintomática originó la propuesta de tres hipótesis explicativas, entre las cuales estaba el concepto de Brumpt de que existían dos especies morfológicamente idénticas, *E. dysenteriae* y *E. dispar*. La aplicación de las técnicas moleculares modernas demostró, en forma irrefutable, que lo que se conocía clásicamente como *E. histolytica* se trataba realmente de dos especies, confirmando el concepto de Brumpt casi 7 décadas después. Estudios recientes han identificado en humanos *E. moshkovskii*, morfológicamente indistinguible de *E. histolytica* y *E. dispar*, así como una gran diversidad genética de cada una de estas especies y heterogeneidad en virulencia entre las razas de *E. histolytica*. La redescipción de *E. dispar* y la identificación de *E. moshkovskii* en humanos han impactado enormemente el conocimiento de *E. histolytica* y la amibiasis con importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas que han conducido a la necesidad de reevaluar la prevalencia y morbilidad de la infección en la población mundial y estudiar la distribución geográfica, prevalencia y modelo de transmisión de las razas de *E. histolytica* para detectar aquellas epidemiológicamente relevantes y predecir el riesgo de la enfermedad amibiana en una población.

Amebiasis: Implications of the recognition of *Entamoeba dispar* and the identification of *Entamoeba moshkovskii* in humans.

Invest Clin 2010; 51(2): 239 - 256

Key words: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, amebiasis.

Abstract. The history of *Entamoeba histolytica* is very confuse and shows several wrong concepts about the parasite and its relationship with the host. The poor correlation between the prevalence of asymptomatic and symptomatic amebiasis originated the proposal of three explicative hypothesis, among them was the concept of Brumpt that *E. histolytica* comprised two morphologically identical species, *E. dysenteriae* and *E. dispar*. The application of modern molecular techniques irrefutably proved that *E. histolytica* was really a complex of two species, confirming the concept of Brumpt almost 7 decades later. Recent studies have identified in humans *E. moshkovskii*, morphologically indistinguishable from *E. histolytica* and *E. dispar*, a great genetic diversity within each of these species, and heterogeneity in virulence among *E. histolytica* strains. The redescription of *E. dispar*, and the recovery of *E. moshkovskii* from humans have had a major impact in our understanding of *E. histolytica* and amebiasis with important clinical and epidemiologic implications. This has led to the need of a reevaluation of the infection in terms of prevalence and morbidity in the global population and to study the geographic distribution, prevalence, and transmission pattern of *E. histolytica* strains in order to detect those with epidemiologic relevance and predict the risk of amebic disease in a population.

INTRODUCCIÓN

La detección de *E. histolytica*, agente causal de la amebiasis, es de suma importancia ya que constituye la tercera causa de mortalidad debida a infección parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis, particularmente en países en vías de desarrollo (1, 2). Durante décadas, un cuadro muy confuso de la relación parásito-hospedador se desencadenó cuando se trató de explicar la gran discrepancia entre el número de infectados asintomáticos y los que desarrollaban la enfermedad. Así surgieron los conceptos de que *E. histolytica* era un parásito tisular obligatorio (3), un comensal

que potencialmente podía causar enfermedad (4) o que existían dos especies morfológicamente iguales, *E. dispar* y *E. dysenteriae*, esta última sería la patógena pero que podía ocasionar infecciones asintomáticas (5). Posteriormente se demostró, mediante el análisis electroforético de las isoenzimas de amibas en cultivo, la existencia de zimodemos (grupos de amibas que comparten los mismos modelos electroforéticos y movilidades para diversas enzimas) patógenos en las amibas que invadían y zimodemos no patógenos para las que no invadían (6-11). Estos estudios confirmaron el concepto de que lo que se consideraba como *E. histolytica* se trataba en realidad de dos especies

morfológicamente iguales. Subsecuentemente, se demostraron diferencias genéticas (12) y se propusieron los nombres *E. histolytica* y *E. dispar* para estas dos especies (13). La primera es un patógeno potencial causante de la amibiasis y la segunda es un comensal. Para confundir más la situación *E. moshkovskii*, indistinguible morfológicamente de las dos especies anteriores e inicialmente descrita sólo en aguas servidas (14-16), se ha identificado recientemente en humanos de diversos países (16-21).

La distribución mundial y la magnitud de la infección con estas tres especies de *Entamoeba* no es conocida, ya que la mayoría de los diagnósticos se siguen basando en el microscopio que no permite diferenciarlas. Los datos actuales sugieren que *E. dispar* es 10 veces más común que *E. histolytica* en el mundo pero que las prevalencias locales pueden variar en forma significativa (22). Sin embargo, lo que sí está claro es que no todas las infecciones con *E. histolytica* conducen a la enfermedad y que sólo una de cada 10 infecciones progresan hacia el desarrollo de manifestaciones clínicas (23).

La redescrición de *E. dispar* y la identificación de *E. moshkovskii* en el hombre han tenido un gran impacto en el conocimiento de la amibiasis con implicaciones clínicas y epidemiológicas. Como consecuencia, es necesaria la reevaluación de estos aspectos, mediante el uso de técnicas de diagnóstico molecular, en forma global.

El objetivo del presente trabajo es revisar los hechos que condujeron al reconocimiento del rango de especie de *E. dispar*, la identificación de *E. moshkovskii* en los humanos y su impacto e implicaciones en el conocimiento de *E. histolytica* y la amibiasis.

PERSPECTIVAS HISTÓRICAS

La historia de *E. histolytica* ha sido muy confusa. Ningún parásito ha sido tan

erróneamente diagnosticado como esta amiba y a muy pocos agentes patógenos se le han atribuido tan amplio espectro de manifestaciones clínicas (24). La historia de la amibiasis, desde su inicio, se ha enfocado en el papel que *E. histolytica* pudiera desempeñar como agente causal de enfermedad y se desarrolló un cuadro muy controversial de la relación parásito-hospedador. La revisión de la historia antigua del parásito revela como surgieron los diversos conceptos erróneos acerca del mismo.

Lambl fue el primero en identificar amibas en el contenido intestinal del hombre en 1859, pero no le dio importancia al hallazgo (25). Losch, en 1875, fue el primero en darle significación a una amiba que observó en las heces y úlceras del colon de un paciente y presentó una excelente descripción de la condición clínica, hallazgos de necropsia y del parásito. Sin embargo, no consideró la amiba como patógena y la denominó *Amoeba coli* (26). Koch, en 1883, describió casos de disentería donde se observaron amibas idénticas a las descritas por Losch, en úlceras intestinales (25). Kartulis, 1885-1891, identificó amibas en los tejidos adyacentes a las úlceras intestinales y las consideró como las causantes de la "disentería tropical" que él había descrito (27-29). Más tarde, observó las amibas en el pus de abscesos hepáticos (30) y en un absceso cerebral (31). A este autor se le ha dado el crédito de descubrir la relación causa-efecto de las amibas y estos procesos patológicos Councilman y Lafleur en 1891 (32) hicieron una descripción magistral, insuperable del absceso hepático amibiano (AHA). Ellos consideraron que no era inflamatorio sino "causado por necrosis, reblandecimiento y licuefacción del tejido" y que las amibas no estaban asociadas a otros organismos. Denominaron a la amiba *Amoeba dysenteriae*.

En Alemania, Quinke y Ross en 1893 (33) y Huber y Shaudinn en 1903 (25) de-

mostraron la fase quística del parásito. Huber realizó la primera descripción del número y características de los núcleos de *Entamoeba histolytica* (25), pero Schaudinn desestimó el trabajo de este autor, que era su alumno, y consideró que estos quistes pertenecían a otra especie que él mismo había observado y para la cual había propuesto el nombre de *E. tetrágena*; también diferenció *E. coli* de la amiba hematófaga que él llamó *E. histolytica* (34). Varios investigadores creyeron que los quistes pertenecían a una nueva especie que llamaron *E. tetrágena* (35). Esta situación creó confusión, pero tal era la estatura científica de Schaudinn que su concepto de que estos quistes cuadrinucleados correspondían a otra especie diferente a *E. histolytica* permaneció inquestionable durante más de una década. Elmassian acuñó el nombre *E. minuta* para los trofozoítos que él observó asociados con los quistes de cuatro núcleos (36). Craig, en 1905, consideró que Councilman y Laflour (32) tenían prioridad para el nombre que ellos le habían asignado a la amiba y que el nombre correcto debía ser *E. dysenteriae* (37). Así que debido a esta controversia en terminología, para 1910 existían cuatro nombres: *E. dysenteriae*, *E. tetrágena*, *E. minuta* y *E. histolytica* para lo que posteriormente se consideró como una entidad única. El último término sobrevivió y el nombre aceptado para el parásito es *Entamoeba histolytica* (34).

Walker demostró que los nombres *E. tetrágena* y *E. minuta* se referían a diferentes fases de *E. histolytica* (38, 39). El experimento clásico de Walker y Sellards en Manila demostró en forma concluyente, por primera vez, que el hombre podía ser infectado con los quistes de *E. histolytica* y desarrollar la enfermedad. Sin embargo, estos experimentos demostraron que la infección con esta amiba no necesariamente resulta en enfermedad y que la mayoría de las infecciones son asintomáticas (40).

La gran discrepancia entre la prevalencia de infecciones asintomáticas de *E. histolytica* y la enfermedad se hizo cada vez más aparente y no era posible predecir la aparición de disentería en portadores de quistes. Al parecer, no se le prestó mucha atención a los hallazgos de Walker y Sellards (40) que permiten apreciar la relación correcta entre la amiba y el hombre, actuando como comensal en la mayoría de los casos. Por el contrario, se desencadenó una gran controversia con respecto a la relación parásito-hospedador durante décadas. Así que en 1920 surgieron dos hipótesis para tratar de explicar la poca correlación entre la prevalencia de portadores de quistes y de la amibiasis invasiva: 1. Dobell planteó que *E. histolytica* era un parásito tisular obligatorio, apareciendo la enfermedad sólo cuando el hospedador perdía la habilidad de tolerar al parásito (3). 2. Kuenen y Swellengrebel consideraron a *E. histolytica* como una amiba comensal que bajo el efecto de algún estímulo podía invadir los tejidos con pérdida de su capacidad para producir quistes y propagar la especie (4). Los dos conceptos diferían básicamente en el estado de los portadores de quistes; según la escuela de Dobell se trataba de un estado de enfermedad, mientras que según los comensalistas no necesariamente era el caso. Las escuelas americanas e inglesas eran seguidoras de la hipótesis de Dobell, mientras que los comensalistas estaban prácticamente confinados al continente europeo. Brumpt, en 1925, planteó la tercera hipótesis. Consideró que existen tres especies de amibas en el hombre que producen quistes cuadrinucleados: *E. hartmanni* con quistes menores de 10 u y dos especies morfológicamente idénticas cuales son: *E. dispar*, especie no patógena y *E. dysenteriae*, especie patógena que podía ocasionar infecciones asintomáticas (5). Aunque esta hipótesis es la que mejor describe la relación parásito-hospedador de acuerdo a los conceptos

contemporáneos, esta concepción no fue ampliamente aceptada sino a partir de 1993 (13), casi 7 décadas después.

Sargeaunt, de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, en conjunto con investigadores de otros países en especial de África del Sur, realizaron estudios de la relación *E. histolytica*-hospedador mediante el uso de electroforesis de isoenzimas en la década de 1978-1988. Estos estudios fueron de gran impacto ya que demostraron que el análisis de isoenzimas de amibas en cultivo podía diferenciar estas especies de *Entamoeba*. Se lograron determinar 24 zimodemos, de los cuales 21 corresponden a aislados de humanos (12 de *E. dispar* y 9 de *E. histolytica*) (6-11). Luego se evidenció, en base a bandas estables, que sólo existían 3 zimodemos (II, XIV, XIX) para *E. histolytica* y uno (I) para *E. dispar*, ya que algunos desaparecen al eliminar la flora bacteriana de los cultivos, sugiriendo que por lo menos algunas bandas son de origen bacteriano (41). Estos estudios confirmaron el concepto de Brumpt de que *E. histolytica* se trataba de dos especies morfológicamente iguales (5). Estudios clínicos, bioquímicos e inmunológicos demostraron diferencias entre las dos especies (8, 42-44). Tannich y col., en Alemania, evidenciaron en forma contundente, mediante el análisis del ADN, que *E. histolytica* y *E. dispar* son diferentes genéticamente (12). Estos hallazgos fueron confirmados por Diamond y Clark, quienes propusieron la nomenclatura de *E. histolytica* y *E. dispar* para las dos especies (13), la cual ha sido aceptada.

Otras de las ideas que crearon incertidumbre en el conocimiento de *E. histolytica* fue el concepto de raza pequeña y grande. Von Prowazek, en 1912, descubrió una amiba intestinal con quistes de 6 a 8 μ de diámetro a la cual denominó *E. hartmanni* (45); Kuenen y Swellengrebel en 1917 y Brugg en 1918, describieron las especies *E.*

tenuis y *E. minutissima*, respectivamente, las cuales fueron consideradas posteriormente como sinónimos de *E. hartmanni* por los mismos autores (24). Smith, en 1918, construyó una curva de distribución del tamaño de 1000 quistes obtenidos de 30 casos y obtuvo una curva bimodal con picos en 7,1 μ y 12,2 μ y concluyó que los quistes de esta especie la dividía en dos razas que diferían sólo en tamaño (24). Dobell, en 1919, concluyó que el tamaño de los quistes de *E. histolytica* variaba de 5 a 20 μ , dependiendo de la raza, y relegó a *E. hartmanni* como sinónimo de *E. histolytica* (3); lo mismo hizo Wenyon en 1926 (24). Este concepto, conocido como la teoría "unicista", promulgado por estos dos últimos eminentes autores facilitó que el mundo de habla inglesa se adhiriera a esta idea. Los "pluralistas" quedaron prácticamente confinados al continente europeo. Brumpt, en 1949, reafirmó el rango de especie de *E. hartmanni* (46), la cual fue aceptada por otros autores (24). Los estudios estadísticos de Saper y col. en 1942, demostraron la existencia de dos poblaciones de quistes de tamaños diferentes (47). Burrows, en 1957 y 1959, realizó estudios morfológicos de la amiba y consideró que se puede diferenciar de *E. histolytica* por el menor tamaño de sus trofozoítos y quistes (48, 49). A pesar de la clara demostración de la existencia de dos poblaciones de quistes con diferentes tamaños (47), no fue sino hasta la publicación de estudios morfológicos por Burrows (48, 49), estudios de cultivo por Freedman y Elsdon-Dew (50) y los resultados de inmunofluorescencia de Goldman y col. (51) que demostraron diferencias entre las dos especies que *E. hartmanni*, originalmente descrita por von Prowazek en 1912 (45), fue aceptada.

Otro evento que causó confusión en el panorama de la amibiasis fue el hallazgo en un paciente con diarrea de Laredo, Texas en 1956 de una amiba morfológicamente

igual a *E. histolytica* pero a diferencia de ésta, era capaz de crecer a temperatura ambiente (52). Esta amiba se conoció como la “raza Laredo de *E. histolytica*”. Subsecuentemente, se demostraron diferencias antigénicas (53), enzimáticas (54), de susceptibilidad a las drogas (55) y de infectividad en animales de experimentación (56, 57). Posteriormente, se aislaron más razas del tipo Laredo y se demostró que tanto éstas como la raza conocida como “Huff” no solo toleraban la temperatura ambiente sino diluciones altas del medio ambiente mediante el desarrollo de vacuolas contráctiles (58).

La raza Laredo de *E. histolytica* es morfológicamente indistinguible de *E. moshkovskii*, especie descrita por primera vez en aguas servidas de Moscú, Rusia por Tshalaia en 1941 (14) y luego en otros países (15) y se consideró como una amiba de vida libre. Ambos tipos de amibas comparten algunos rasgos biológicos, que las diferencian de la clásica *E. histolytica* y *E. dispar*, como la capacidad de crecer a temperatura ambiente, la osmotolerancia y la resistencia a la emetina (16, 59). Clark y Diamond en 1991, demostraron, mediante estudios moleculares, que la raza Laredo de *E. histolytica* es una raza de *E. moshkovskii* (16). Aunque los primeros aislamientos de esta amiba se hicieron de aguas servidas, posteriormente se ha identificado cada vez con mayor frecuencia en humanos (16-21). Estas son amibas que probablemente han sido diagnosticadas erróneamente como *E. histolytica*. De tal manera que de las varias especies del género *Entamoeba*, seis se han identificado en el hombre: *E. coli*, *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. polecki* y *E. moshkovskii*.

Los argumentos controversiales acerca de si *E. histolytica* era una especie o comprendía más de una, o si era siempre un patógeno o un comensal potencialmente patógeno obscurecieron el conocimiento de la correcta relación parásito-hospedador. Frente a las francas manifestaciones de la disen-

tería y el AHA, el diagnóstico clínico y parasitológico no deben presentar mucha dificultad para los clínicos y parasitólogos expertos. Sin embargo, la interpretación del hallazgo de quistes en ausencia de síntomas manifiestos es lo que puede ofrecer dificultad. La literatura está repleta de falsas asociaciones de la amiba con una diversidad de manifestaciones clínicas, tales como síntomas oculares, alergias y artritis reumatoide, lo cual Elsdon-Dew denominó “amibiasis iatrogénica” (24). Este panorama dudoso se debió en gran parte al concepto de la escuela de Dobell de que *E. histolytica* era un parásito tisular obligatorio (3).

CONCEPTUALIZACIÓN ACTUAL

En las dos últimas décadas, la biología molecular ha permitido la caracterización de *Entamoeba* y la detección de diferencias genéticas, previamente desconocidas, dentro de este género lo cual ha revolucionado su taxonomía y el conocimiento de la epidemiología y la relación parásito-hospedador en la amibiasis. La aplicación de las técnicas moleculares modernas permitió conocer que lo que se conocía clásicamente como *E. histolytica* comprendía dos especies, *E. histolytica* y *E. dispar*. De las seis especies de *Entamoeba* que residen en el intestino humano, tres son indistinguibles morfológicamente: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

En base a la redefinición de *E. histolytica*, se estimó que del 10% de la población mundial que alberga *E. histolytica* y *E. dispar* (2), 90% están colonizados por *E. dispar* y sólo el 10% por *E. histolytica* (23, 60, 61); sólo una de cada 10 infecciones produce enfermedad (62).

Entamoeba histolytica puede ocasionar infecciones asintomáticas o sintomáticas intestinales o extraintestinales con manifestaciones clínicas de colitis, absceso hepático e infecciones genitourinarias, respirato-

rias y cerebrales (25, 63). El portador de quistes, asintomático o ligeramente sintomático, es la forma más común de la infección y representa el 90% de los casos (62, 64). La infección puede desaparecer espontáneamente sin haber producido enfermedad o conducir a la amibiasis intestinal sintomática u otros tipos de formas clínicas (23, 65-67). Estudios longitudinales de individuos con infecciones asintomáticas de *E. histolytica* durante un año, demostraron que de 4 a 10% desarrollaron la enfermedad intestinal o extraintestinal (23, 65). Se acepta que los perfiles de anticuerpos a *E. histolytica*/*E. dispar* reportados en estudios seroepidemiológicos de la amibiasis (68-70) están relacionados a *E. histolytica* y que *E. dispar* no produce reacciones serológicas (42, 71).

AVANCES RECIENTES

Aunque *E. dispar* se ha considerado como una especie comensal, estudios recientes han identificado esta amiba en pacientes con síntomas gastrointestinales (19, 20, 72, 73). Sin embargo, hasta el presente, no existen evidencias de una relación causa-efecto entre el parásito y la sintomatología. Existen reportes, algunos basados en estudios de zimodemos patógenos y no patógenos, de que *E. dispar* puede tener efectos patógenos, tales como la destrucción de monocapas de células epiteliales in vitro (74), lesiones intestinales focales en animales (75-77) y cambios patológicos en humanos (78). Sin embargo, los hallazgos no han cumplido los postulados de Koch y no se han realizado estudios controlados para determinar si *E. dispar* realmente es un patógeno potencial.

Estudios recientes han reportado la presencia de *E. moshkovskii* en humanos de diferentes naciones, tales como Estados Unidos, Italia, Irán, Turquía, Bangladesh, India y Australia (16-21, 79). La posición

taxonómica de *E. moshkovskii* todavía no se conoce con exactitud; parece ser un complejo de por lo menos dos especies (16). Este parásito ha sido considerado como un comensal. Sin embargo, estudios recientes en India y Bangladesh lo han identificado como el único probable enteropatógeno potencial en pacientes con manifestaciones gastrointestinales, incluyendo la disentería (17, 19). Sin embargo, no se sabe si estos pacientes tenían otros agentes bacterianos o virales que fueran patógenos. Se necesitan más estudios para determinar si esta amiba es patógeno potencial.

Los factores que determinan la virulencia de *E. histolytica* continúan siendo un enigma. Las variables dependientes del parásito y del hospedador que contribuyen al desarrollo de la enfermedad no están claras; probablemente exista una interacción compleja entre la genética, inmunidad, nutrición y flora intestinal del hospedador y los rasgos genéticos del parásito. Una posibilidad es que el genotipo de la amiba determine su patogenicidad. Estudios de aislados de *E. histolytica* de diversas áreas geográficas demostraron la existencia de un gran polimorfismo en los genes SREHP (80) y SSG (81). Se han evidenciado diferencias genéticas entre razas de *E. histolytica* causantes de enfermedad intestinal o hepática mediante la demostración de polimorfismo en el gen SREHP (82). Sin embargo, otro estudio no fue consistente con estos hallazgos (83). Estudios de *E. dispar*, usando ADN extraído de muestras fecales y el gen quitinasa como un marcador, revelaron la presencia de diferentes razas en diversas áreas geográficas (84, 85). Actualmente se ha demostrado polimorfismo variable para estas dos especies (86-88), indicando su potencial para ser usado como marcador para investigar la epidemiología de estas amibas. También se han reportado considerables diferencias genéticas en aislados de *E. moshkovskii* (59).

IMPLICACIONES CLÍNICAS

Diagnóstico

La existencia de *E. dispar* y *E. moshkovskii*, morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica* al microscopio, implica la necesidad de utilizar métodos de diagnóstico que permitan distinguir estas tres especies, sobre todo porque *E. dispar* parece ser más común que *E. histolytica* (22) y ésta se considera como la única especie de *Entamoeba* patógena. Esta situación condujo a la Organización Mundial de la Salud a recomendar el desarrollo de técnicas que permitan el diagnóstico específico de *E. histolytica* (89) y ha estimulado a los investigadores a desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico para diferenciar estas tres especies de *Entamoeba* en los laboratorios clínicos. El diagnóstico adecuado de *E. histolytica* es de suma importancia, no solo para los pacientes con la enfermedad sino también para aquellos que tienen infecciones asintomáticas ya que éstas se pueden transmitir con facilidad de persona a persona, especialmente en el mundo en vías de desarrollo donde prevalecen el inadecuado saneamiento ambiental y tratamiento de agua potable (90).

Recientemente, se han desarrollado varios métodos de diagnóstico molecular, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, para el diagnóstico específico de cada una de estas tres especies de *Entamoeba* en los laboratorios clínicos. Actualmente existe una gran variedad de métodos de la PCR dirigidos a diferentes genes para la detección y diferenciación de estas amibas (91).

La consistente diversidad genética detectada en la pequeña subunidad ARNr (18SADNr) de *E. histolytica* y *E. dispar* inició el uso de este gen como blanco de diferenciación de las dos especies (92-95). Las técnicas de la PCR dirigidas a este gen son 100 veces más sensibles que el mejor kit de análisis inmunoenzimático (ELISA) actual-

mente disponible (96, 97) y son ampliamente usadas para distinguir estas especies ya que existen múltiples copias de estos genes en las amibas (98), lo cual hace más fácil la detección del gen 18SADNr que un fragmento de ADN de una única copia de un gen. Para la identificación de *E. moshkovskii* también se desarrolló una técnica de la PCR usando como objetivo el 18SADNr (18), la cual tiene una alta sensibilidad y especificidad con ADN extraído directamente de las heces (20). La PCR en tiempo real es un método reciente y muy atractivo para el diagnóstico de *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que con esta metodología se consume menos tiempo porque se elimina el análisis post-PCR y se reducen el riesgo de resultados falsos positivos y el costo de los reactivos (99). Sin embargo es un procedimiento costoso.

La aplicación de las técnicas de la PCR, especialmente la PCR en tiempo real, en los laboratorios clínicos es factible especialmente en países industrializados por el hecho de que, en estas áreas, la amibiiasis afecta principalmente sólo algunos grupos de alto riesgo, tales como los viajeros, inmigrantes de áreas endémicas, homosexuales masculinos (100-105) y personas mentalmente discapacitadas (106). Los países en vías de desarrollo, donde *E. histolytica* y la morbilidad y mortalidad que ocasiona son más prevalentes, se beneficiarán menos de estas técnicas debido a sus restricciones económicas. En estas regiones, la detección de antígenos de *E. histolytica* en heces por ELISA, mediante el kit de *E. histolytica* II generación de Tech Lab, es una buena opción para el diagnóstico en laboratorios clínicos donde no sea factible la utilización de los métodos moleculares (107, 108) ya que la técnica es sencilla y de fácil ejecución. La combinación de esta prueba con técnicas serológicas ofrece la mejor metodología para el diagnóstico de los casos clínicos. La limitación de estas técnicas es la inhabili-

dad para diferenciar las infecciones actuales de las pasadas lo que dificulta un diagnóstico clínico (23, 108). Sin embargo, una reacción serológica fuertemente positiva es altamente sugestiva de una amibiasis invasiva presente. De estas pruebas, ELISA es la más usada en los laboratorios de diagnóstico. Este método es fácil de realizar y se considera que es suficiente para fines clínicos, especialmente para el diagnóstico de AHA. También es útil para la evaluación de la amibiasis intestinal y extraintestinal en los casos en que se sospeche y las amibas no son detectadas en el examen coprológico (108). Se ha demostrado que un kit comercial de microtitulación por ELISA (LMD Laboratories Inc. Carlsbad, CA, USA) tiene una sensibilidad de 97,9% y una especificidad de 94,8% para la detección de anticuerpos a *E. histolytica* en pacientes con AHA (109). La técnica de ELISA es útil en el laboratorio clínico ya que no da reacciones cruzadas con otros parásitos (63, 110-114).

Tratamiento

El advenimiento de las técnicas moleculares no solo ha representado un gran avance en el diagnóstico clínico de la amibiasis, sino también en la selección adecuada de los pacientes que deben recibir tratamiento anti-amibiano. En áreas endémicas, la conducta clínica es tratar todos los pacientes infectados, con o sin manifestaciones clínicas, para evitar que los portadores de quistes asintomáticos sirvan como fuentes de infección para otros individuos. Esta conducta terapéutica determina el uso inadecuado de drogas anti-amibianas en pacientes infectados con *E. dispar* y *E. moshkovskii* y el uso indiscriminado de estas drogas contra *E. histolytica* lo cual pudiera determinar la aparición de razas resistentes al tratamiento (115,116). La aplicación de las técnicas moleculares en el laboratorio clínico para detectar el ADN de *E. histolytica* en muestras de heces o absceso hepático per-

mite un diagnóstico confiable de la amiba, un manejo adecuado de los pacientes y la selección correcta de aquéllos que requieren la terapia específica (89).

IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

La diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en humanos, a través de la caracterización molecular, en la última década del siglo XX (13) condujo a la necesidad de reevaluar la epidemiología de la amibiasis en relación a la prevalencia y morbilidad en la población mundial, especialmente en las áreas con alta endemicidad. La mayoría de los datos existentes en la literatura se obtuvieron mediante métodos incapaces de distinguir estas tres especies. Además, para complicar la situación existen amibas intestinales similares morfológicamente a *E. histolytica* como *E. hartmanni* y *E. polecki*, esta última es un parásito de cerdos y monos y no es muy frecuente en el hombre; en nuestra región se ha reportado en 8 ocasiones en humanos (117-120). La mayoría de las encuestas realizadas en el mundo antes de 1955, no reconocían *E. hartmanni* como una entidad separada (48-51) y aun después de esa fecha ha sido muy poco reportada en países en vías de desarrollo, tal es el caso de Venezuela. Sin embargo, se ha demostrado que esta especie está ampliamente distribuida, lo cual sugiere que es diagnosticada como *E. histolytica*. Nosotros hemos demostrado que *E. hartmanni* es común en la región en estudios realizados desde 1976, usando técnicas de tinción y concentración (121-128). En nuestra experiencia, es posible que por su pequeño tamaño no sea detectada a menudo en exámenes de heces al fresco o en material concentrado, o si se detectan los rasgos morfológicos pueden ser tan indistinguibles que dificulta el diagnóstico específico. El uso de una preparación teñida y un micrómetro ocular elimina estas fuentes

de error. Cuando el diagnóstico diferencial depende de detalles citológicos finos, es necesaria una preparación teñida para su identificación.

De acuerdo a la estimación global de la magnitud de la morbilidad y mortalidad de la amibiasis, reportada por Walsh en 1986 (2), *E. histolytica*/*E. dispar* infecta alrededor del 10% (500 millones) de la población mundial y el 10% de los infectados (alrededor de 50 millones) padece alguna enfermedad. De éstos, se estima que del 80% al 98% presentan disentería y del 2 al 20% tienen lesiones extraintestinales, de las cuales el AHA es la patología más frecuente. Alrededor del 2 al 10% de los casos de amibiasis invasiva son fatales. Con la redefinición de *E. histolytica*, la incidencia mundial de la amibiasis invasiva sería de 5 millones de casos por año y la mortalidad seguiría siendo de 100.000 casos anuales (22, 71).

La redescrición de *E. dispar* y la recuperación de *E. moshkovskii* en humanos han tenido un impacto dramático en la epidemiología de *E. histolytica* lo cual determina la necesidad de su reevaluación mundial. Tres características son relevantes para el estudio del parásito y su relación con el hospedador, cuales son la prevalencia de la infección, la invasión tisular y la morbilidad que denota daño tisular suficiente para producir una lesión macroscópica o alteración funcional demostrable. En la mayoría de las poblaciones donde el parásito es endémico, la prevalencia permanece estable, las tasas de incidencia y morbilidad son bajas, las infecciones son propensas a la desaparición espontánea y la reinfección es común. Estos rasgos de la amibiasis representan problemas para su estudio epidemiológico (129).

Una mejor reevaluación de la epidemiología de *E. histolytica* pudiera llevarse a cabo a través de estudios de prevalencia del parásito mediante técnicas moleculares e investigaciones serológicas para evaluar la

prevalencia de la amibiasis invasiva. La seropositividad es un parámetro de menor valor para evaluar la morbilidad, puesto que la mayoría de los individuos que desarrollan invasión tisular por el parásito se hacen seropositivos, al menos temporalmente, y sólo una proporción de éstos desarrollan lesiones clínicamente significativas; se desconoce esta proporción y si es similar en poblaciones diferentes (129). Desde el punto de vista epidemiológico, los estudios serológicos son muy importantes porque reflejan la importancia de la amibiasis invasiva en una población. Las curvas bimodales reportadas por Kagan (70) serían los perfiles normales de anticuerpos en un área endémica donde los títulos más altos corresponden a infecciones presentes y los más bajos a infecciones pasadas; cuando la distribución de anticuerpos se inclina hacia los títulos altos sugiere la existencia de una epidemia (42). Nuestros estudios seroepidemiológicos realizados en la región durante más de una década revelaron tasas de seropositividad de 4,4% a 46,6%, presentando la mayoría de los seropositivos títulos bajos y no revelaron infecciones con *E. histolytica*/*E. dispar* ni síntomas compatibles con la amibiasis, lo cual sugiere que los títulos positivos reflejan amibiasis invasiva pasada. Estos resultados indican que la amibiasis invasiva es un problema de salud pública importante en la región pero que su importancia varía de un área a otra, ocurriendo la transmisión de la infección con mucha mayor frecuencia que la amibiasis invasiva (123, 124, 130, 131). Para reevaluar la prevalencia de la infección y de la amibiasis invasiva en nuestro país, es necesario realizar estudios epidemiológicos a gran escala combinando las técnicas moleculares o de detección de antígeno para identificar el parásito y los métodos serológicos, lo cual ofrece la mejor forma de abordar el diagnóstico. Recientemente, dos estudios en el país, utilizando la técnica de la PCR, reportaron prevalencias de 6,3% a

10,8% para *E. histolytica* y 4,4% a 7,8% para *E. dispar* (132, 133).

De estos datos epidemiológicos surgen preguntas sin responder en relación a la virulencia del parásito. Como por ejemplo, por qué solo el 10% de los infectados desarrollan la enfermedad y por qué la morbilidad está restringida en la mayoría de los casos al intestino (89). La existencia del parásito como comensal en el 90% de los infectados (64) sugiere que estos individuos albergan organismos no patógenos o que las condiciones del hospedador no permiten que las amibas se conviertan en virulentas.

La observada heterogenicidad en virulencia entre las razas de *E. histolytica*, que pudiera determinar la habilidad de una raza para causar amibiasis invasiva ha estimulado los estudios epidemiológicos moleculares para determinar si algunas razas son mas propensas que otras para causar enfermedad. El análisis del polimorfismo existente en *E. histolytica* en áreas endémicas es importante para estudios de distribución geográfica del parásito (134, 135), detección del modelo de transmisión de las razas, así como para predecir el riesgo a la enfermedad amibiana en una población.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como espectadores y partícipes del campo de investigación de la amibiasis, vislumbramos un futuro muy interesante y promisorio para esta parasitosis. La aplicación de la moderna tecnología de la biología molecular en el diagnóstico de *E. histolytica*, conducirá a una mejor comprensión de su compleja epidemiología, del problema de salud pública que representa la amibiasis y las estrategias preventivas y de control adecuadas para la infección. Estas medidas, al parecer, han sido inefectivas ya que la morbilidad y mortalidad ocasionadas por la amibiasis han persistido, a pesar de la existencia de terapia específica efectiva.

En el laboratorio clínico se deben utilizar las técnicas moleculares para detectar *E. histolytica* en muestras fecales y de absceso hepático, lo cual ayudaría al médico clínico en el diagnóstico correcto de la amibiasis y a la selección adecuada de los pacientes que ameritan la terapia antiamebiana y así se evitarán los tratamientos innecesarios en pacientes con infecciones debidas a otras especies de *Entamoeba*.

Las técnicas moleculares, incluyendo la PCR convencional y la PCR en tiempo real, que se han desarrollado para la detección y diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* han conducido a la reevaluación de la epidemiología de la amibiasis en algunos países. Sin embargo, es necesaria la aplicación global de estos estudios, en especial en áreas de alta endemicidad. En los estudios epidemiológicos de *E. histolytica*, es necesario el análisis del polimorfismo lo cual es una estrategia promisorio para determinar la distribución de grupos o razas relevantes epidemiológicamente en el mundo. Es necesario continuar los estudios de epidemiología molecular para determinar si algunas razas de *E. histolytica* son mas propensas que otras para causar enfermedad, dada la variedad en virulencia de ellas.

Debido a la observación de que *E. dispar* es más común que *E. histolytica*, la identificación en aumento de *E. moshkovskii* en humanos, la asociación de *E. dispar* y *E. moshkovskii* con síntomas en algunos estudios y el polimorfismo genético de estas dos especies, es recomendable el diagnóstico y tipeaje simultáneos de estas especies en los estudios clínicos y epidemiológicos de la amibiasis.

Con la aplicación de las diversas técnicas modernas basadas en la biología molecular, se han hecho grandes avances en el conocimiento de la amibiasis. Mientras más se estudie y se conozca la biología molecular de *E. histolytica*, mayor será el potencial

de nuevos logros y para develar el misterio del por qué se convierte en patógeno.

CONCLUSIONES

La aplicación de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de la amibiasis ha conducido a la redescrición de *E. dispar* y la identificación de *E. moshkovskii* en humanos lo cual ha impactado enormemente el conocimiento de *E. histolytica* y la amibiasis con importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas.

La diferenciación molecular de estas especies de *Entamoeba* ha conducido a una mejor comprensión de la relación *E. histolytica*-hospedador, a evitar tratamientos innecesarios y a la necesidad de reevaluar la prevalencia y morbilidad de la infección en la población mundial, especialmente en las regiones de alta endemicidad. El estudio del polimorfismo existente en *E. histolytica* en áreas endémicas es importante para investigar la distribución geográfica y el modelo de transmisión de las razas, lo cual permite predecir el riesgo a la enfermedad amibiana en una población. La utilización de las técnicas moleculares en el diagnóstico de *E. histolytica* conducirá a un mejor conocimiento de la amibiasis.

REFERENCIAS

1. **Anonymous.** Amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72:97-99.
2. **Walsh JA.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986; 8:228-238.
3. **Dobell C.** The amoebae living in man. A zoological monograph. London: John Bale, Sons Danielsson, Ltd Publishers; 1919, p 1-51.
4. **Kuenen WA, Swellengrebel NH.** Die entamoben des menschen und ihre praktische bedeutung. Cent Bakteriol 1913; 71 378-410.
5. **Brumpt E.** Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe á kystes quadrinucleés, parasite de l'homme. Bull Acad Méd Paris 1925; 94:943-952.
6. **Sargeant PG, Williams JE, Grene JD.** The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72:519-521.
7. **Sargeant PG, Williams JE.** Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and nonpathogenic intestinal amoebae of man. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73: 225-227.
8. **Sargeant PG, Jackson TF, Simjee A.** Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, specially those from liver abscess. Lancet 1982; i:1386-1388.
9. **Sargeant PG.** Zymodemes expressing possible genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:86-89.
10. **Sargeant PG.** The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. Parasitol Today 1987; 3:40-43.
11. **Sargeant PG, Jackson TF, Wiffen SR, Bhojnani R.** Biological evidence of genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82:862-867.
12. **Tannich E, Burchard GD.** Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. J Clin Microbiol 1991; 29:250-255.
13. **Diamond LS, Clark CG.** A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993; 40:340-344.
14. **Tshalaia LE** On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. Med Parazit (Moscow) 1941; 10: 244-252.
15. **Scaglia M, Gatti S, Strosselli M, Grazioli V, Villa MR.** *Entamoeba moshkovskii* (Tshalaia, 1941): morpho-biological characterization of new strains isolated from the environment, and a review of the literature. Ann Parasitol Hum Comp 1983; 58:413-422.

16. **Clark CG, Diamond LS.** The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 46:11-18.
17. **Haque R, Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr.** A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitol Int* 1998; 47:201-202.
18. **Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA Jr, Haque R, Clark CG.** *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:580-584.
19. **Parija, SC, Khairnar K.** *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *J Health Pop Nutr* 2005; 23:292-295.
20. **Fotadar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.** PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1035-1037.
21. **Tanyuksel M, Ulukanligil M, Guclu Z, Araz E, Koru O, Petri W A Jr.** Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:723-724.
22. **Huston CD, Petri WA Jr.** Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Curr Infect Dis Rep* 1999; 1: 441-447.
23. **Gathiram V, Jackson TF.** A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 1987; 72:669-672.
24. **Elsdon-Dew R.** The epidemiology of amoebiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6:1-62.
25. **Anderson HH, Bostick WL, Johnstone HG.** Amebiasis. 1st Ed. Springfield (Ill): Charles C Thomas Publisher; 1953, p 3-11.
26. **Lösch F.** Massenhafte Entwicklung von amöben in Dickdarm. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1875; 65:196-211.
27. **Kartulis S.** Ueber riesen amöben bei chronischer darmentzündung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1885; 99:145-150.
28. **Kartulis S.** Zur aetiologie der dysenterie in Aegypten. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1886; 105: 521-531.
29. **Kartulis S.** Einiges über die pathogenese der dysenterieamöben. *Zbl Bakt (abt. 1)* 1891; 9:365-369.
30. **Kartulis S.** Ueber tropische leberabscesse und ihr verhältniss zur dysenterie. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1889; 118:97-102.
31. **Kartulis S.** Gehirabscesse nach dysenterischen leberabscessen. *Zbl Bakt* 1904; 37:527-530.
32. **Councilman WT, Lafleur HA.** Amebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp Report* 1891; 2:395-548.
33. **Quincke HI, Roos E.** Ueber amoeben-enteritis. *Wien Med Wchnsehr* 1893; 30: 1089-1094.
34. **Schaudinn F.** Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Phizopoden. *Arb GesundhAmt* 1903; 19: 547-561.
35. **Hartmann M.** Eine neue Dysenterieamöbe, *Entamoeba tetrágena* (Viereck) syn: *Entamoeba africana* (Hartmann). *Arch Schiffs-u Tropen Hyg* 1908; 5:117-127.
36. **Elmassian M.** Sur une nouvelle espèce amibienne chez l'homme, *Entamoeba minuta* sp. nov. *Zbl Bakt I Abt Orig* 1909; 52:335-351.
37. **Craig CF.** Observations upon amebas infecting human intestine, with description of two species, *Entamoeba coli* and *Entamoeba dysenteriae*. *Am Med* 1905; 9: 854-936.
38. **Walker EL.** The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals. *J Med Res* 1908; 17: 379-459.
39. **Walker EL.** A comparative study of the amoebae in the Manila water supply, in the intestinal tract of healthy persons, and in amoebic dysentery. *Philipp J Sci* 1911; 6:259-279.
40. **Walker EL, Sellards AW.** Experimental entamoebic dysentery. *Philipp J Sci* 1913; 8:253-331.
41. **Jackson TF, Suparsad S.** Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Arch Med Res* 1997; 28:304-305.
42. **Jackson TF, Gathiram V, Simjee AE.** Seropidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1985; i:716-719.

43. **Strachan WD, Chiodini PL, Spice WM, Moody AH, Ackers JP.** Immunological differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *E. histolytica*. *Lancet* 1988; i:561-563.
44. **Stauffer W, Ravdin JI.** *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect* 2003; 16:479-485.
45. **Von Prowazek S.** Weiterer Beitrag zur Kenntnis der *Entamoeben*. *Arch Protistenk* 1912; 26:241-254.
46. **Brumpt E.** Précis de Parasitologie. Sixième Ed. Paris: Masson et Cie Publishers; 1949, p 1-32.
47. **Sapero JJ, Hakansson EG, Louttit CM.** The occurrence of two significantly distinct races of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med* 1942; 22:191-208.
48. **Burrows RB.** *Entamoeba hartmanni*. *Am J Hyg* 1957; 65:172-188.
49. **Burrows RB.** Morphological differentiation of *Entamoeba hartmanni* and *E. polecki* from *E. histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1959; 8:583-589.
50. **Freedman L, Elsdon-Dew R.** Size variation in *Entamoeba histolytica*. *Nature* 1958; 181:433-434.
51. **Goldman M, Carver RK, Gleason NN.** Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. II. *E. histolytica* and *E. hartmanni*. *Exper Parasitol* 1960; 10:366-388.
52. **Dreyer DA.** Growth of a strain of *Entamoeba histolytica* at room temperature. *Texas Rep Biol Med* 1961; 19:393-396.
53. **Goldman M, Gleason NN, Carver RK.** Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody III. Reactions of the Laredo strain with 5 anti-*histolytica* sera. *Am J Trop Med Hyg* 1962; 11:341-346.
54. **Bragg PD, Reeves RE.** Pathways of glucose dissimilation in the Laredo strain of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasit* 1962; 12:393-400.
55. **Entner N, Most H.** Genetics of *Entamoeba*: Characterisation of two new parasitic strains which grow at room temperature (and at 37°C). *J Protozool* 1965; 12:10-13.
56. **Goldman M, Cannon LT.** Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. V. Comparison of 15 strains of *Entamoeba*, with information on their pathogenicity to guinea-pigs. *Am J Trop Med Hyg* 1967; 16:245-254.
57. **Neal RA, Johnson P.** The virulence to rats of five *Entamoeba histolytica-like* strains capable of growth at 25°C and attempts to discover similar strains. *Parasitology* 1968; 58:599-603.
58. **Richards CS, Goldman M, Cannon LT.** Cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica-like* strains at reduced temperature and behaviour of the amoebae in diluted media. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15:648-655.
59. **Clark CG, Diamond LS.** Intraspecific variation and phylogenetic relationship in the genus *Entamoeba* as revealed by ribotyping- *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44:142-154.
60. **Gathiram V, Jackson TF.** Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. *Lancet* 1985; i:719-721.
61. **Ravdin JI, Jackson TF, Petri WA Jr, Murphy CF, Ungar BLP, Gathiram V, Skilogiannis J, Simjee AE.** Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1990; 162:768-772.
62. **Stamm WP, Ashley MJ, Bell K.** The value of amoebic serology in an area of low endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976; 70:49-53.
63. **Tanyuksel M, Petri WA Jr.** Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:713-729.
64. **Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo G, Bruno A, Mascinati R, Bisoffi Z, Scaglia M.** Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:123-127.
65. **Haque R, Ali IM, Sack RB, Farr B M, Ramakrishnan G, Petri WA Jr.** Amebiasis and mucosal IgA antibody against the

- Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 2001; 183:1787-1793.
66. Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi H D, Muller-Myhsok B, Buss H, Tannich E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:578-583.
67. Blessmann J, Van AL, Tannich E. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. *Arch Med Res* 2006; 37: 270-272.
68. Juniper K, Worrel CL, Minshew C, Roth LS, Cypert H, Lloyd RE. Seroepidemiology of amebiasis in Arkansas. *Arch Inv Med (Méx.)* 1971; 2(suppl 1):445-452.
69. Healy GR, Gleason NN. The seroepidemiology of amebiasis. *Arch Inv Med (Méx.)* 1972; 3(suppl 2):449-458.
70. Kagan IG. Seroepidemiology of amebiasis. En: Sepúlveda V, Diamond L, Eds. *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*. México: 1976. P 574-587.
71. Jackson TF. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol* 1998; 28:181-186.
72. Jetter A, Walderich B, Britten D, Mete O, Goral V, Burchard GD, Ackers J. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in eastern Turkey using a colorimetric polymerase chain reaction. *Arch Med Res* 1997; 28(suppl):319-321.
73. Visser LG, Verweij JJ, Van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:397-403.
74. Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties, and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol* 1998; 45:265-272.
75. Chadee K, Smith JM, Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:870-878.
76. Espinosa-Cantellano M, Castañón Gutiérrez G, Martínez-Palomo A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 1997; 28:S204-S206.
77. Vohra H, Bhatti H S, Ganguly N K, Mahajan RC. Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:648-650.
78. McMillan A, Gilmour H M, McNeillage G, Scott GR. Amoebiasis in homosexual men. *Gut* 1984; 25:356-360.
79. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, Petri WA Jr. Comparison of stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2258-2261.
80. Stanley SL Jr, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 4976-4980.
81. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TF, Stanley SL. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol* 1991; 29:696-701.
82. Ayeh-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA Jr, Haque R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp Parasitol* 2001; 99:80-88.
83. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3748-3756.
84. Ghosh S, Frisardi M, Ramírez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramírez K, Newton-Sánchez OA, Santos-Preciado JI, Ganguly C, Lohia A, Reed S, Samuelson J. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (demo-

- graphic sweep) and trancontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3815-3821.
85. Ramos F, García G, Valadez A, Morán P, González E, Gómez A, Melendro EI, Valenzuela O, Ximénez C. *E. dispar* strain: analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 141:175-177.
 86. Zaki M, Clark CG. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:897-905.
 87. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark C G. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1271-1276.
 88. Pinheiro SM, Maciel RF, Morais MA Jr, Aca IS, Carvalho LB Jr, Coimbra MR. Genetic characterization of *Entamoeba dispar* isolates in Northeast Brazil. *Acta Trop* 2005; 94:35-40.
 89. World Health Organization. World Health Organization/Pan American Health Organization/ UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:97-99.
 90. Jackson TF. Epidemiology. En: Ravdin JI Ed. *Amebiasis*. London: Imperial College Press; 2000. P 47-63.
 91. Fotedar R, Stark D, Beeben N, Marriot D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:511-532.
 92. Clark CG, Diamond L S. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 49:297-302.
 93. Que X, Reed SL. Nucleotide sequence of a small subunit ribosomal RNA (16S-like rRNA) gene from *Entamoeba histolytica*: differentiation of pathogenic from non-pathogenic isolates. *Nucleic Acids Res* 1991; 11:5438.
 94. Clark CG, Diamond LS. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch Med Res* 1992; 23:15-16.
 95. Cruz-Reyes JA, Spice WM, Rehman T, Gisborne E, Ackers JP. Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 1992; 104:239-246.
 96. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. 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*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2405-2407.
 97. Troll H, Marti H, Weiss N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1701-1705.
 98. Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS, Soldo AT. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool* 1989; 36:455-458.
 99. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002; 8:257-260.
 100. Takeuchi T, Kobayashi S, Asami K Yamaguchi N. Correlation of positive syphilis serology with invasive amebiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36:321-324.
 101. Nozaki T, Motta SR, Takeuchi T, Kobayashi S, Sargeant PG. Pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* in Japanese homosexual population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:525.
 102. Takeuchi T, Okuzawa E, Nozaki T, Kobayashi S, Mizokami M, Minoshima N, Yamamoto M, Isomura S. High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection. *J Infect Dis* 1989; 159: 808.
 103. Ohnishi K, Murata M, Okuzawa E. Symptomatic amebic colitis in a Japanese homosexual AIDS patient. *Inter Med* 1994; 33:120-122.
 104. Ohnishi K, Murata M. Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-south-east area of Tokyo. *Epidemiol Infect* 1997; 119:363-367.
 105. Ohnishi K, Kato Y, Imamura A, Fukayama M, Tsunoda T, Sakaue Y,

- Sakamoto M, Sagara H. Present characteristics of symptomatic *Entamoeba histolytica* infection in the big cities of Japan. *Epidemiol Infect* 2004; 132:57-60.
106. Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T, Haghighi A. Diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. *Arch Med Res* 2006; 37:277-279.
107. Haque R, Kress K, Wood S, Jackson TF, Lyerly D, Wilkins T, Petri WA Jr. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose specific adhesin. *J Infect Dis* 1993; 167: 247-249.
108. Rosenblatt JE, Sloan LM, Bestrom JE. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection in serum of *Entamoeba histolytica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22:275-278.
109. Hira PR, Iqbal J, Al-Ali F, Philip R, Grover S, D'Almeida E, Al-Eneizi AA. Invasive amebiasis: challenges in diagnosis in a non-endemic country (Kuwait). *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:341-345.
110. Grundy MS. Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76:396-400.
111. Randall GR, Goldsmith RS, Shek J, Mehalko S, Heyneman D. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Entamoeba histolytica* antigen in faecal samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78:593-595.
112. Braga LL, Mendonca Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcante AL, Mann BJ. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3044-3045.
113. Shamsuzzaman SM, Haque R, Hasin SK, Hashiguchi Y. Evaluation of indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. *J Parasitol* 2000; 86:611-615.
114. Goncalves ML, da Silva VL, de Andrade CM, Reinhard K, da Rocha GC, Le Bailly M, Bouchet F, Ferreira LF, Araujo A. Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:88-91.
115. Martínez-Palomo A, Martínez-Baez M. Selective primary health care: strategies for control of diseases in the developing world X. Amebiasis. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 1093-1102.
116. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N. In vitro activity of antiamoebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 21:3-27.
117. Chacín-Bonilla L. Successful treatment of human *Entamoeba polecki* infection with metronidazole. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:521-523.
118. Chacín-Bonilla L. *Entamoeba polecki* infection in Venezuela. Report of a new case. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:137.
119. Chacín-Bonilla L. *Entamoeba polecki* human infections in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:634.
120. Chacín-Bonilla L, Guanipa N, Cano G, Parra AM, Estévez J, Raleigh X. Epidemiological study of intestinal parasitic infections in a rural area from Zulia state, Venezuela. *Interciencia* 1998; 23:241-247.
121. Chacín-Bonilla L, Guanipa N, Arapé-García R. Prevalencia de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni* y otros parásitos intestinales en niños hospitalizados. *Invest Clín* 1976; 17: 25-41.
122. Chacín-Bonilla L, Dikdan Y. Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y otros parásitos intestinales en una comunidad suburbana de Maracaibo. *Invest Clín* 1981; 22:185-203.
123. Chacín-Bonilla L, Bonpart D. A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30:1201-1205.
124. Chacín-Bonilla L, Chacín-Martínez E, Espinoza E, Cárdenas B. A seroepidemiological study of amebiasis in children of low socioeconomic level in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31:1103-1106.
125. Chacín-Bonilla L, Dikdan Y, Guanipa N, Villalobos R. Prevalencia de *Entamoeba*

- histolytica* y otros parásitos intestinales en un barrio del municipio Mara, edo. Zulia, Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1990; 31:3-15.
126. Chacín-Bonilla L, Mejía-Young M, Cano G, Guanipa N, Estévez J, Bonilla E. *Cryptosporidium* infections in a suburban community in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:63-67.
127. Chacín-Bonilla L, Guanipa N, Cano G, Parra AM, Estévez J, Raleigh X. Epidemiological study of intestinal parasitic infections in a rural area from Zulia state, Venezuela. *Interciencia* 1998; 23:241-247.
128. Chacín-Bonilla L, Sánchez-Chávez Y. Intestinal parasitic infections, with special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:347-352.
129. Knight R. Surveys for amoebiasis. Interpretation of data and their implications. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69:35-48.
130. Chacín-Bonilla L, Mathews HM, Healy GR, Dikdan Y, Rodríguez-Zambrano N. Serologic and parasitologic studies of amebiasis in two suburban communities of Maracaibo, Venezuela. *Invest Clín* 1984; 25:69-80.
131. Chacín-Bonilla L, Mathews HM, Dikdan Y, Guanipa N. Estudio seroepidemiológico de la amebiasis en una comunidad del estado Zulia, Venezuela. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1990; 32:467-473.
132. Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H. Estudio epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. *Invest Clín* 2008; 49:225-237.
133. Rivero Z, Bracho A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, Chourio G, Arráiz N, Corzo G. Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del estado Zulia, Venezuela. *Cad Saúde Pública*. 2009; 25:151-159.
134. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4081-4090.
135. Ramos F, García G, Valadez A, Morán P, González E, Gómez A, Melendro EI, Valenzuela O, Ximénez C. *E. dispar* strain: Analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution. *Mol Biochemical Parasitol* 2005; 141:175-177.