

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Parasitología**



**AMEBIASIS EN ESPAÑA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
Y ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE UNA PARASITOSIS  
EMERGENTE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**María José Gutiérrez Cisneros**

Bajo la dirección de las doctoras  
Teresa Gárate Ormaechea e Isabel de Fuentes Corripio

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-0156-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**AMEBIASIS EN ESPAÑA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y  
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE UNA PARASITOSIS  
EMERGENTE**

**M<sup>a</sup> JOSÉ GUTIÉRREZ CISNEROS  
MADRID 2007**

***ÍNDICE***

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Conceptos generales y taxonomía</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Ciclo biológico y ultraestructura</b> .....	<b>5</b>
2.1. Ciclo biológico.....	5
2.2. Trofozoíto.....	6
2.3. Quiste.....	8
<b>3. Epidemiología</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Manifestaciones clínicas de la amebiasis</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Diagnóstico de laboratorio</b> .....	<b>14</b>
5.1. Microscopía.....	15
5.2. Cultivo.....	18
5.3. Análisis isoenzimático.....	20
5.4. Detección de anticuerpos.....	21
5.5. Detección de antígeno en heces (Coproantígeno).....	23
5.6. Análisis de ADN.....	25
5.7. Métodos de caracterización.....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>1. Desarrollo y validación de una técnica de PCR con aplicación para el diagnóstico y diferenciación de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i></b> .....	<b>37</b>
1.1. Optimización de las condiciones de trabajo para una <i>nested-PCR</i> .....	37
1.2. Determinación de la sensibilidad de la <i>nested-PCR</i> con ADN de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> procedente de cultivo axénico.....	40
1.3. Estudio de especificidad con otros parásitos.....	40
1.4. Elección del método de extracción de ADN a partir de muestras biológicas.....	41
1.4.1. Extracción de ADN con tiocianato de guanidina.....	41
1.4.2. Extracción de ADN con un método comercial.....	42

1.5. Elección de las condiciones para el envío de las muestras de heces .....	43
<b>2. Aplicación Clínica de la PCR.....</b>	<b>44</b>
2.1. Enfermos .....	44
2.1.1. Diagnóstico de <i>E. histolytica</i> en pacientes con amebiasis extraintestinal.....	44
2.1.2. Diagnóstico y diferenciación de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> en muestras de heces.....	44
2.2. Procesamiento de las muestras.....	45
2.2.1. Heces .....	45
2.2.2. Muestra del absceso hepático .....	45
2.2.3. Suero.....	46
2.3. Técnicas empleadas para el diagnóstico de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> en el laboratorio.....	46
2.3.1. Examen microscópico .....	46
2.3.2. Detección de anticuerpos frente a <i>E. histolytica</i> en suero .....	47
2.3.3. PCR .....	47
<b>3. Caracterización genotípica de las cepas de <i>E. histolytica</i> de los pacientes con amebiasis .....</b>	<b>48</b>
3.1. Genotipado de <i>E. histolytica</i> por análisis del locus 1-2.....	48
3.1.1. Amplificación.....	48
3.1.2. Secuenciación de los productos de amplificación del locus 1-2 .....	50
3.1.2.1. Purificación de los productos de la amplificación.....	50
3.1.2.2. Secuenciación.....	51
3.2. Genotipado de <i>E. histolytica</i> por análisis del gen SREHP .....	51
3.2.1. Amplificación.....	51
3.2.2. Secuenciación de los productos de amplificación del gen SREHP .....	53
<b>4. Análisis de los resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Desarrollo y validación de una técnica de PCR con aplicación para el diagnóstico y diferenciación de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>.....</b>	<b>56</b>
1.1. Optimización de las condiciones para una <i>nested</i> -PCR .....	56
1.2. Determinación de la sensibilidad de la <i>nested</i> -PCR con ADN de <i>E.</i> <i>histolytica</i> y <i>E. dispar</i> procedente de cultivo axénico.....	58

1.2. Determinación de la sensibilidad de la <i>nested</i> -PCR con ADN de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> procedente de cultivo axénico.....	59
1.3. Estudio de especificidad con otros parásitos .....	60
1.4. Elección del método de extracción de ADN a partir de muestras biológicas.....	60
1.5. Elección de las condiciones para el envío de las muestras de heces.....	61
<b>2. Aplicación Clínica de la PCR.....</b>	<b>62</b>
2.1. Diagnóstico de <i>E. histolytica</i> en pacientes con amebiasis extraintestinal .....	62
2.2. Diagnóstico y diferenciación de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> en muestras de heces .....	64
<b>3. Caracterización de las cepas de <i>E. histolytica</i> obtenidas de los pacientes con amebiasis .....</b>	<b>74</b>
3.1. Genotipado de <i>E. histolytica</i> por análisis del locus 1-2 .....	74
3.1.1. Amplificación .....	74
3.1.2. Secuenciación de los productos de amplificación del locus 1-2.....	75
3.2. Genotipado de <i>E. histolytica</i> por análisis del gen SREHP .....	82
3.2.1. Amplificación .....	82
3.2.2. Secuenciación de los productos de amplificación de SREHP.....	82
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>106</b>

## ***INTRODUCCIÓN***

## 1. Conceptos generales y taxonomía

La amebiasis se define actualmente como la infección por el parásito *Entamoeba histolytica*. Es responsable de unas 100.000 muertes al año, siendo la segunda causa de mortalidad por parásitos protozoarios después de la malaria. Su distribución es mundial, especialmente prevalente en zonas tropicales y subtropicales con condiciones higiénico-sanitarias deficientes.

En nuestro país, se ha producido un aumento de la amebiasis en los últimos años. Este incremento se ha observado, principalmente, en viajeros y en inmigrantes procedentes de zonas en las que la enfermedad es endémica (García-Forcada *et al.* 1995). Por otra parte, este aumento de la amebiasis importada parece estar relacionado con la descripción de casos autóctonos en España (Gutiérrez-Cisneros *et al.* 2007; Saez-Pobre *et al.* 2004; Díaz-González *et al.* 2005; Anton 2005; Ruiz *et al.* 2004). En los tres últimos años, el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, que actúa como laboratorio de referencia en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, ha detectado un incremento muy significativo tanto en el número de casos de amebiasis intestinales como de amebiasis diseminada.

La primera descripción de la amebiasis fue realizada por Fedor Lösch, en 1875 en San Petersburgo. Este autor aisló unos trofozoítos móviles en las heces de un campesino con disentería, que llamó *Amoeba coli*. En 1903, Schaudinn introduce el nombre *Entamoeba histolytica* para la ameba productora de disentería, separándola de las no patógenas que denominó *Entamoeba coli*. En 1925, Dobell describe el ciclo biológico de *E. histolytica*. En ese mismo año, Brumpt emitió la hipótesis de la dualidad de las amebas. Basado en consideraciones epidemiológicas, propuso la existencia de dos especies de amebas idénticas morfológicamente. La ameba de distribución cosmopolita sería la no patógena y la llamó *Entamoeba dispar*, mientras que la localizada en ciertos países tropicales en los que la disentería y el absceso hepático son frecuentes, sería otra ameba, a la que dio el nombre de *E. dysenteriae*. Sin embargo, su

hipótesis no fue aceptada durante los siguientes 50 años. En 1961, Diamond (Diamond 1961) logró el primer cultivo axénico de *E. histolytica*. En 1978, Sargeant (Sargeant *et al.* 1978) reportó diferencias utilizando análisis de isoenzimas, encontró distintos zimodemas entre las especies patógenas y las no patógenas de *E. histolytica*. Finalmente, en 1993, Diamond y Clark (Diamond & Clark 1993) en base a las diferencias genómicas, bioquímicas e inmunológicas observadas, propusieron la separación de las dos especies, llamando a la especie patógena *E. histolytica* y a la comensal *E. dispar* en honor a Brumpt. Dicha división fue definitivamente aceptada. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Anonymous 1997), en 1997, recomienda utilizar técnicas que permitan distinguir entre las dos especies, ya que *E. histolytica* es responsable de todos los casos de enfermedad invasora, colitis y absceso hepático, pero también, en muchas ocasiones, de colonización asintomática. Mientras que *E. dispar* sólo coloniza el tracto digestivo y no causa enfermedad.

La clasificación taxonómica de este parásito de acuerdo a Cavalier-Smith (Cavalier-Smith 1998), es la siguiente:

Imperio o Superreino Eukaryota

Reino Protozoa

Subreino Neozoa

Infrarreino Sarcomastigota

Filo Amoebozoa

Subfilo Conosa

Infracilo Archamoeba

Clase Entamoebae

Orden Entamoebida

Familia Entamoebidae

Género *Entamoeba*

Especie *Entamoeba histolytica*

El género *Entamoeba* comprende varias especies, seis de las cuales pueden habitar en el intestino del hombre, *E. histolytica*, *E. dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba hartmanni* y *Entamoeba coli*. Las tres primeras, *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* son morfológicamente idénticas, pero presentan diferencias genéticas y bioquímicas. *E. histolytica* es considerada patógena, mientras que *E. dispar* y *E. moshkovskii* son consideradas no patógenas.

Debe señalarse, que trabajos publicados en los últimos años han indicado que *E. moshkovskii* podría causar infecciones. Esta especie se conocía anteriormente como *E. histolytica* variedad Laredo (Clark & Diamond 1991b), y se consideraba como una ameba de vida libre, que raramente infecta a humanos, mostrando como particularidad su capacidad para crecer a temperatura ambiente. Sin embargo, estudios actuales realizados en Bangladesh, en los que se emplearon herramientas moleculares, revelaron una prevalencia de *E. moshkovskii* del 21% en niños de 2 a 5 años (Ali *et al.* 2003), sugiriendo que quizá el hombre es un hospedador habitual de esta ameba de vida libre.

Recientemente, otro trabajo efectuado en Australia por Fotedar y colaboradores (2007b), en el que utilizaron una técnica de PCR para la detección de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras de heces de pacientes con examen microscópico positivo, encontraron que el 61,8% de los pacientes era portador de *E. moshkovskii*. Además, todos los pacientes infectados con *E. moshkovskii* tenían sintomatología, por lo que según los autores hay que reconsiderar su papel patógeno.

En los dos trabajos citados, más de la mitad de las muestras con *E. moshkovskii* también contenían *E. histolytica* o *E. dispar*, por lo que esta elevada asociación podría producir errores a la hora de considerar *E. moshkovskii* como una nueva especie patógena.

## 2. Ciclo biológico y ultraestructura

### 2.1. Ciclo biológico

El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica*. La vía de transmisión es fecal-oral. El quiste, que es la forma infectante, se elimina por las heces contaminando el agua, los alimentos y transmitiendo la infección de persona a persona.

El ciclo biológico de *E. histolytica* es directo (figura 1). El hombre se infecta por la ingestión de los quistes maduros que atraviesan el estómago, donde sufren la acción de los jugos gástricos. La ruptura del quiste tiene lugar en la región del ileon terminal o en el colon, dando origen a los trofozoítos.

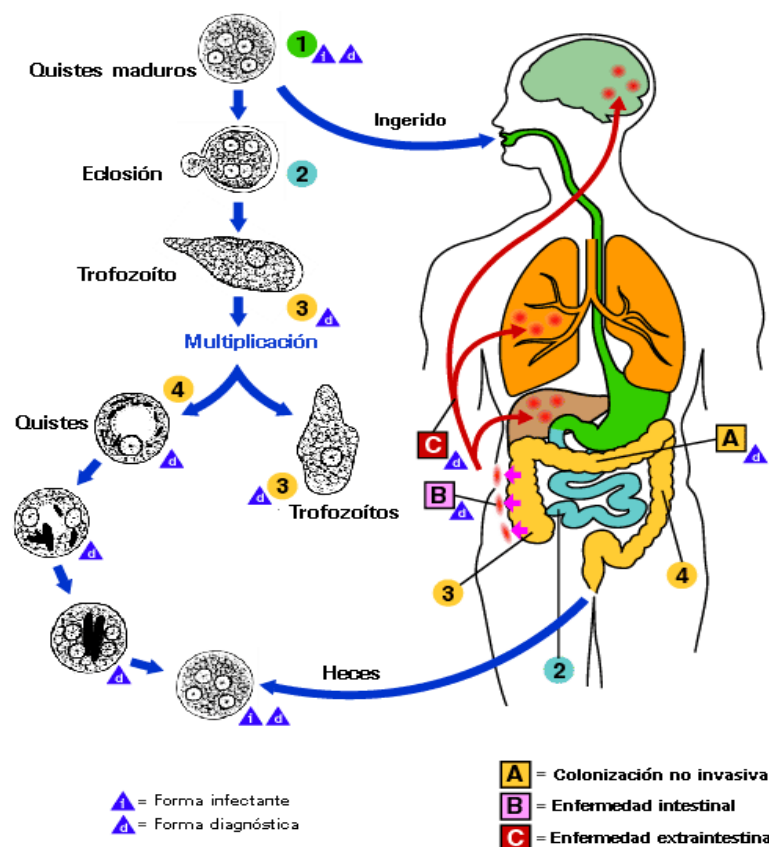


Figura 1. Ciclo biológico (CDC)

En el comienzo de su formación estos conservan el mismo número de núcleos de los quistes, cada núcleo se divide en dos y resulta un trofozoíto con ocho núcleos. En el colon cada uno de estos ocho núcleos se rodea de una porción de citoplasma, formando ocho trofozoítos. Los trofozoítos son móviles y se adhieren e invaden la mucosa intestinal, donde se multiplican por fisión binaria, continuando su ciclo biológico. En la luz del intestino, los trofozoítos eliminan las vacuolas alimenticias, se inmovilizan y se transforman en prequistes, mediante la adquisición de una cubierta, para, posteriormente, convertirse en quistes inmaduros con un núcleo. Finalmente, estas estructuras se transforman en el quiste maduro tetranucleado.

Los trofozoítos son rápidamente destruidos en el medio ambiente mientras que los quistes pueden permanecer fuera del hospedador semanas o meses, dependiendo principalmente de las condiciones de humedad, aunque pueden destruirse a temperaturas extremas ( $-5^{\circ}$  y  $40^{\circ}$ ).

## 2.2. Trofozoíto

El tamaño de la célula varía entre 12 y 60  $\mu\text{m}$ , debido no solamente al pleomorfismo del parásito, sino también por el origen de aislamiento de la ameba. En las heces diarreicas o lesiones hepáticas, generalmente, el tamaño es más grande (20  $\mu\text{m}$  – 40  $\mu\text{m}$ ) que en la heces no diarreicas y cultivos (10  $\mu\text{m}$  – 30  $\mu\text{m}$ ). Tienen un único núcleo con cromatina periférica uniforme y cariosoma puntiforme localizado en el centro. El citoplasma de *E. histolytica* puede contener eritrocitos fagocitados, propiedad que sirve para diferenciarla de *E. dispar* (Bruckner 1992).



**Figura 2.** Trofozoíto

## Núcleo

Tiene un tamaño entre 4  $\mu\text{m}$  – 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La membrana nuclear se presenta como una doble membrana interrumpida por numerosos poros de aproximadamente 65 nm. La cromatina está generalmente uniformemente repartida dentro de la membrana nuclear. El cariosoma es una masa pequeña y esférica, aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, localizada en la parte central del núcleo y que parece no corresponderse con el nucleolo de otras células eucariotas (Ravdin 2000).

## Citoplasma

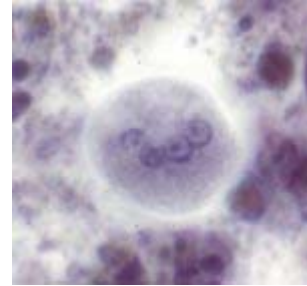
El citoplasma de *E. histolytica* carece de la mayor parte de los orgánulos típicos de las células eucariotas, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, centriolos y microtúbulos. En su lugar, el citoplasma contiene abundantes vacuolas con un tamaño muy variable. También, hay que destacar que recientemente se han descrito unos orgánulos denominados mitosomas (Tovar *et al.* 1999), con un tamaño de 1  $\mu\text{m}$  y doble membrana (Aguilera *et al.* 2007). Parece que los mitosomas derivan de las mitocondrias, y todavía se desconoce su función.

## Estructura del genoma

En 2005, se publicó el genoma de *E. histolytica* (HM-1:IMSS), con 23.752 Kb y una media de 9.900 genes (Loftus *et al.* 2005). En cuanto al número y tamaño de los cromosomas que lo componen, siguen sin determinarse. Es importante citar que los genes del ARN ribosomal (rADN) en *E. histolytica*, así como en *E. dispar*, presentan la particularidad de que se encuentran localizados en moléculas de ADN circulares llamadas episomas (Bhattacharya *et al.* 1989; Bhattacharya *et al.* 1998). Se han descrito aproximadamente unas 200 copias por genoma (Ravdin 2000).

### 2.3. Quiste

Los quistes inmaduros, pueden tener de uno a cuatro núcleos. Contienen glucógeno y agregados de ribosomas, llamados cuerpos cromatoides, que presentan forma de barra con los extremos redondeados. Los quistes maduros tienen cuatro núcleos y miden alrededor de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , el glucógeno desaparece y los cuerpos cromatoides pueden estar ausentes (Bruckner 1992).



**Figura 3.** Quiste

### 3. Epidemiología

*E. histolytica* presenta distribución mundial. Es endémica en países con instalaciones y condiciones higiénico-sanitarias deficientes, donde no hay barreras entre las heces contaminadas con quistes, los alimentos y el agua. Las zonas endémicas son Méjico y los países de Sudamérica, de África y del Sudeste Asiático. La mayoría de los casos de amebiasis en América del Norte y Europa son importados (Tanyuksel & Petri 2003).

La forma más frecuente de transmisión es a través de los alimentos o del agua contaminados con los quistes, pero no hay que olvidar la transmisión de persona a persona. Se han descrito casos de contagios dentro de la misma familia (Vreden *et al.* 2000; Gatti *et al.* 1995) y por prácticas de sexo oral (Thompson *et al.* 1983). Además, los quistes pueden ser diseminados por artrópodos, sugiriendo que estos insectos pueden jugar un papel en la transmisión del parásito (Tanyuksel & Petri 2003).

La verdadera prevalencia e incidencia de la infección por *E. histolytica* y *E. dispar*, desde la separación formal de las dos especies, es desconocida. Esto se debe a que el diagnóstico de amebiasis, en la mayor parte de las zonas, sigue realizándose mediante el examen microscópico y éste no puede diferenciar entre las dos especies.

En 1986, Walsh calculó (Walsh 1986) que la prevalencia mundial de la amebiasis se situaba en 480-500 millones de personas infectadas. Un estudio más reciente en África indica que *E. dispar* es 10 veces más frecuente que *E. histolytica*, aunque la prevalencia en otras áreas puedan variar significativamente (Stauffer & Ravdin 2003). Con estos datos, la prevalencia de *E. histolytica* podría ser de 50 millones y la de *E. dispar* de 450 millones.

Además, se han registrado variaciones estacionales de la prevalencia de la amebiasis. Generalmente, el comienzo de la estación lluviosa está asociado a un aumento de los casos. Sin embargo, en Nigeria, se ha reportado un incremento de la prevalencia durante la estación seca, por el uso de agua contaminada debido a la sequía. Las condiciones de humedad y temperatura también influyen en la transmisión del parásito, por lo que se han descrito grandes diferencias entre la costa y el interior (Ravdin 2000).

Por tanto, determinar la verdadera prevalencia de amebiasis es difícil. Los estudios de poblaciones específicas pueden sobrestimar la frecuencia de la infección, ya que hay ciertos grupos en los que la amebiasis es más habitual que en la población general, como por ejemplo, en familias de pacientes infectados (Zaki *et al.* 2003a), en personas que viven en instituciones cerradas (Rivera *et al.* 2006) y en los hombres homosexuales. Debe señalarse no obstante, que en los homosexuales la especie predominante parece ser *E. dispar* (Goldmeier *et al.* 1986; Allason-Jones *et al.* 1986), aunque recientemente Fotedar y colaboradores (2007b) han encontrado también una elevada prevalencia de *E. histolytica* en homosexuales en Australia. Otros casos de amebiasis invasora han sido reportados en homosexuales de Taiwán y Korea (Oh *et al.* 2000).

Estudios aplicando técnicas moleculares realizados en distintas áreas geográficas han revelado interesantes diferencias, según las zonas analizadas. En África, un trabajo llevado a cabo en Etiopía (Kebede *et al.* 2003), en un área donde se creía que existía una alta prevalencia de amebiasis, cuando se sustituyó el diagnóstico microscópico por las

técnicas de biología molecular, se descubrió que el diagnóstico de amebiasis era erróneo en gran parte de los casos, ya que la ameba que se detectaba era *E. dispar* y otras amebas comensales, y no *E. histolytica*. Este trabajo demuestra que el diagnóstico por microscopía en enfermos con diarrea puede llevar a una clasificación errónea de los pacientes con una infección intestinal.

Resultados similares han sido descritos por Verweij y colaboradores (2003), en Ghana. En este estudio se observó que en una zona rural, donde se encontraba una elevada prevalencia del complejo *E. histolytica/E. dispar* por microscopía, dicha prevalencia no se confirmaba cuando se utilizaba una técnica molecular basada en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ya que sólo un individuo estaba infectado por *E. histolytica*, y el resto de los enfermos estaban colonizados por otras amebas.

Estudios realizados en otros países confirman lo señalado en los párrafos anteriores. En Irán (Solaymani-Mohammadi *et al.* 2006) se analizaron personas asintomáticas portadores de quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar*. Los autores utilizaron una técnica de PCR y encontraron que todos los sujetos del estudio eran portadores de *E. dispar*. Otro trabajo con técnicas moleculares realizado en Nicaragua por Leiva y colaboradores (2006), reveló que la frecuencia *E. dispar* en la población estudiada era cinco veces mayor que la de *E. histolytica*.

Sin embargo, otros estudios han revelado lo contrario, confirmando que existen grandes diferencias regionales en cuanto a la distribución de la amebiasis. Un trabajo comparativo de Stauffer y colaboradores (Stauffer *et al.* 2006), realizado en paralelo en Sudáfrica y en Egipto, ha puesto de manifiesto una elevada prevalencia de *E. histolytica*, cuando se usaron métodos moleculares diagnósticos. La frecuencia de la ameba patógena fue significativamente superior a la detectada en los trabajos comentados previamente, siendo muy cercana a la frecuencia de *E. dispar*, con cifras de pacientes infectados superiores al 20%. Resultados parecidos a los de este estudio comparativo se han encontrado en México (Ramos *et al.*

2005), en el estado de Morelos, se encontró una frecuencia mayor de *E. histolytica* (13,8%) que de *E. dispar* (9,7%). En Bangladesh se obtuvieron resultados similares en un trabajo en pacientes con diarrea (Haque *et al.* 1997). Y por último, en la ciudad de Hué, en Vietnam, un estudio reveló una prevalencia muy alta de *E. histolytica* (Blessmann *et al.* 2006), y quizá el dato epidemiológico más destacado del estudio fue la elevada incidencia de AHA (absceso hepático amebiano).

En España, no existen muchos estudios sobre amebiasis intestinal, ya que parece que no se detectan casos autóctonos tras la mejora en las condiciones higiénicas, que se han producido en el último siglo. Otros autores han publicado algunos casos autóctonos de amebiasis intestinal diagnosticados por microscopía (Pérez Trallero *et al.* 1985), pero nadie ha podido confirmar estos casos por las nuevas técnicas moleculares, por lo que no se puede descartar que se trataran de casos de diarrea con *E. dispar* como comensal, y que fueran erróneamente diagnosticados como amebiasis intestinal. Por otro lado, Díaz-González y colaboradores publicaron en el 2005, la revisión más completa sobre AHA autóctono en nuestro país. Se incluyeron diez casos diagnosticados en los últimos 20 años. En seis de ellos no hubo antecedente de contagio de persona a persona. En algunos de estos casos sin antecedentes epidemiológicos, entrevistas posteriores demostraron la existencia de contactos, no admitidos previamente, con personas procedentes de zonas endémicas. En otros no se consiguió encontrar una explicación para el contagio.

Esta situación permite especular sobre la presencia del parásito en España. *E. histolytica* es un parásito cosmopolita. La presencia de esta ameba en nuestro país podría explicarse por las condiciones climatológicas adecuadas (humedad y temperatura) de alguna región española, que favorecen la persistencia de las formas quísticas, por las bajas condiciones higiénicas de ciertas zonas, como por ejemplo áreas rurales de Galicia, y por el aumento de personas infectadas, por el fenómeno migratorio, que podría incrementar la presencia del parásito en el medio ambiente.

Tampoco existen estudios fiables sobre la seroprevalencia de la amebiasis en España. Sólo se ha publicado un trabajo realizado en Huelva, en 1998. Se encontraron 19 (1,79%) casos con serología positiva, entre las 1.056 personas analizadas. En todos los casos, excepto uno, los títulos obtenidos fueron bajos (Perea *et al.* 1998).

Por tanto, el tema de la amebiasis autóctona en España sigue siendo controvertido. Por un lado, es posible que los casos antiguos de amebiasis intestinal estuvieran mal diagnosticados, al utilizarse sólo la microscopía. Por otra parte, el aumento de los casos detectados en España parece estar asociado al fenómeno migratorio, que hace que haya aumentado la circulación del parásito en el ambiente. Pero también, podría argumentarse, que con el desarrollo de las técnicas diagnósticas moleculares, con su sensibilidad y su especificidad elevadas, se ha mejorado la detección del parásito, y que en algunas zonas rurales, con saneamientos antiguos, podrían existir algunos casos autóctonos, que eran subestimados en las décadas pasadas.

#### **4. Manifestaciones clínicas de la amebiasis**

##### **Colonización asintomática**

Se considera que el estado de portador asintomático es la manifestación más frecuente de la amebiasis, encontrándose en el 90% de los individuos infectados (Walsh 1986). Hay que destacar que estos estudios se realizaron en base al examen microscópico de las heces. También es importante reseñar que en individuos con una infección asintomática, se pueden detectar anticuerpos frente a *E. histolytica* en ausencia de enfermedad invasora (Gathiram & Jackson 1987; Ravdin *et al.* 1990).

Por último, es aceptado que los portadores asintomáticos de *E. histolytica* tienen que ser tratados ya que pueden desarrollar una colitis o amebiasis extraintestinal, aunque lo más frecuente es que la infección se resuelva espontáneamente (Blessmann *et al.* 2003).

## **Disentería y Colitis amebiana**

Los síntomas comunmente atribuidos a la colitis producida por *E. histolytica* incluyen dolor abdominal y diarrea (sanguinolenta o mucosa). La diarrea puede ocurrir con 10 o incluso más deposiciones por día. En algunas ocasiones produce una pérdida de peso. A diferencia de los pacientes con diarrea bacteriana, la fiebre no es una manifestación frecuente, observándose en menos del 40% de los casos (Tanyuksel & Petri 2003). La presencia de cristales de Charcot-Leyden y de sangre son el hallazgo más común en las heces durante el estado agudo. La visualización de una única muestra de heces presenta baja sensibilidad para la detección del parásito. El mejor método diagnóstico es la detección del antígeno o ADN de *E. histolytica* en las heces (Fotedar *et al.* 2007a).

El diagnóstico clínico de la amebiasis es difícil por la naturaleza inespecífica de los síntomas. Se puede confundir con shigelosis y con otras diarreas producidas por bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Escherichia coli* que son frecuentes en países tropicales y subtropicales. Además, es muy importante y complicado diferenciar la disentería de los síntomas de patologías intestinales no infecciosas como la enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa isquémica y diverticulitis, en parte por la ausencia de fiebre en pacientes con la parasitosis.

Ocasionalmente pueden ocurrir complicaciones de la amebiasis intestinal como el desarrollo de colitis fulminante, ameboma, amebiasis cutánea y fístulas.

## **Amebiasis extraintestinal**

El absceso hepático es la manifestación más frecuente de la amebiasis extraintestinal. El perfil característico del paciente con un absceso amebiano es el de un varón, con una edad media de 20 a 40 años. Existen dos patrones de presentación principales: agudo, con fiebre elevada y dolor en hipocondrio derecho; y subagudo, en el que predomina la pérdida de peso, siendo menos frecuente el dolor abdominal y la fiebre. Es poco

frecuente que coexistan las manifestaciones extraintestinales y la disentería amebiana (Hughes & Petri, Jr. 2000). La diseminación de un absceso hepático hasta el pericardio es la complicación más peligrosa. La extensión del absceso a pleura es una complicación relativamente frecuente. La peritonitis se produce por perforación de una úlcera del colon o por rotura de un absceso. El absceso cerebral es una manifestación muy poco frecuente.

## 5. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico tradicional de la amebiasis se ha basado durante muchos años en la microscopía. Sin embargo, desde la separación formal de *E. histolytica* en dos especies, la patógena *E. histolytica* y la comensal *E. dispar*, las técnicas microscópicas no son válidas para diferenciarlas, ya que son idénticas morfológicamente. No obstante debe indicarse que existen diferencias bioquímicas, genómicas e inmunológicas entre las dos amebas. Estas diferencias pueden desglosarse de la forma siguiente (Ackers 2002):

- Análisis isoenzimático, principalmente con la hexoquinasa
- Epitopos específicos, que son reconocidos por anticuerpos monoclonales
- Diferencias en la secuencia del ADNr del episoma
- Diferencias significativas (2-18%) en la secuencia de genes homólogos
- *E. histolytica* se adapta con mayor facilidad a los cultivos axénicos. Conseguir cultivos axénicos de *E. dispar* es extremadamente complicado (Clark 1995)
- El examen de los cultivos axénicos de ambas especies por microscopía electrónica muestra diferencias, principalmente en la apariencia de la superficie. Esto parece estar relacionado con la falta de lipofosfoglicano en la superficie de *E. dispar* (Bhattacharya *et al.* 2000)

Por tanto, según las características citadas, las dos especies pueden distinguirse por análisis isoenzimáticos, por anticuerpos monoclonales que detectan antígenos de superficie del parásito en heces y por análisis de la secuencia de ADN.

### **5.1. Microscopía**

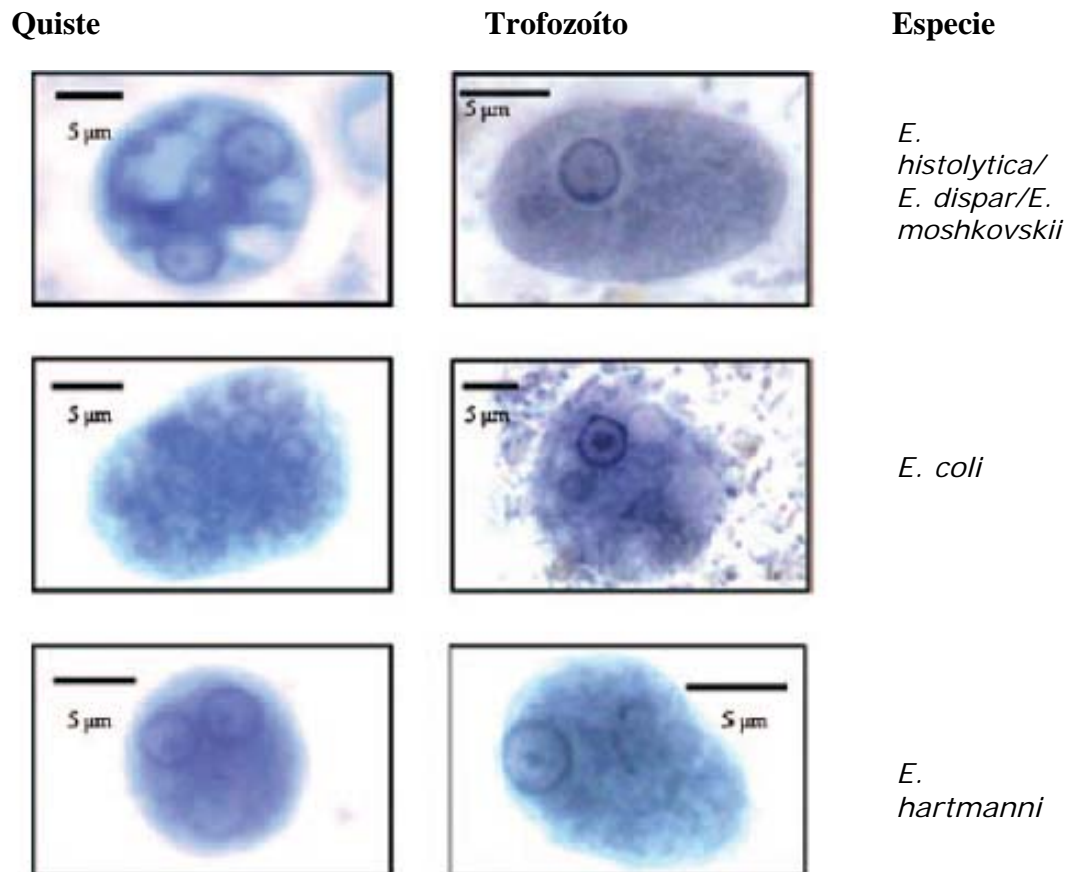
Las técnicas microscópicas empleadas en el diagnóstico de laboratorio incluyen preparaciones en fresco, así como métodos de concentración de la muestra y tinciones permanentes, que permiten identificar *E. histolytica*/*E. dispar* en heces.

El examen microscópico directo de las heces en fresco es un método muy poco sensible (<10%) (Huston *et al.* 1999). La muestra se debe examinar en las primeras horas tras la recogida y no conviene refrigerarla, ya que los trofozoítos pueden perder su movilidad.

Los quistes y los trofozoítos de las dos especies no pueden distinguirse microscópicamente, sólo se diferencian si se visualizan trofozoítos hematófagos. Se considera que el hallazgo de eritrocitos en el citoplasma del trofozoíto es diagnóstico de *E. histolytica* (Gonzalez-Ruiz *et al.* 1994). Dicha observación requiere un alto nivel de experiencia del microscopista, ya que es fácil confundirlos con macrófagos y con trofozoítos de otras especies (Kebede *et al.* 2004b; Kebede *et al.* 2003; Doganci *et al.* 2004). Sin embargo, en pacientes que no presenten disentería aguda, los trofozoítos suelen aparecer sin eritrocitos en el citoplasma; además, los portadores asintomáticos de *E. histolytica* eliminan generalmente sólo quistes en las heces. Estas características indican que la visión de trofozoítos hematófagos es un hallazgo muy poco frecuente (Strachan *et al.* 1988). Por otra parte, algunos estudios han llamado la atención sobre la capacidad de *E. dispar* de fagocitar eritrocitos *in vitro* (Trissl *et al.* 1978).

En relación con la escasa sensibilidad de la microscopía, los métodos de concentración de heces se emplean rutinariamente para mejorar la

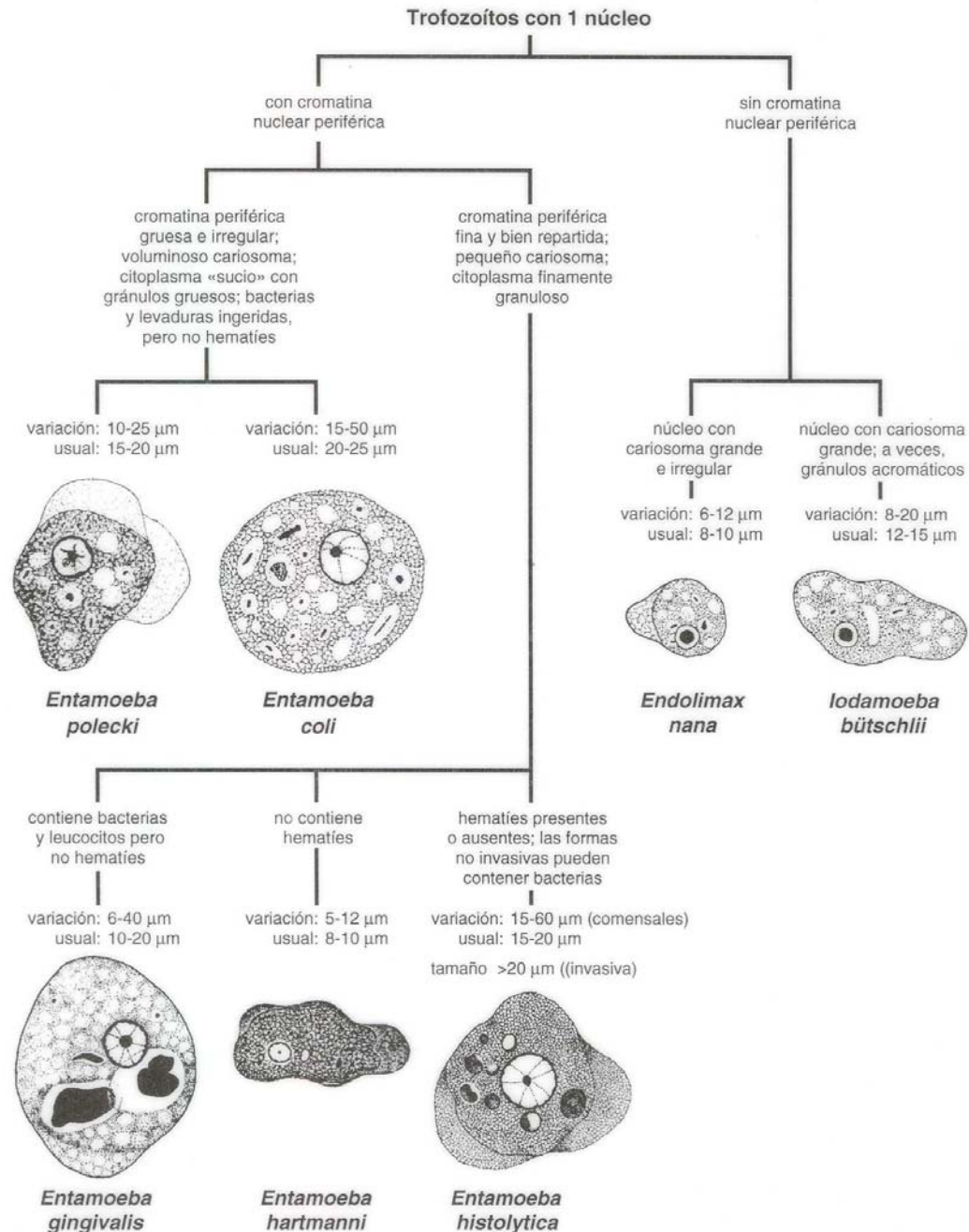
fiabilidad del examen microscópico, ya que así se alcanzan porcentajes de detección del 60% (Fotedar *et al.* 2007a). Estos métodos tienen el inconveniente de que suele destruir los trofozoítos, lo que disminuye aún más la especificidad. Por otra parte, si se realiza un estudio seriado de tres muestras de heces recogidas en un periodo de 10 días, mejora la sensibilidad hasta alcanzar el 85% (Li & Stanley, Jr. 1996).



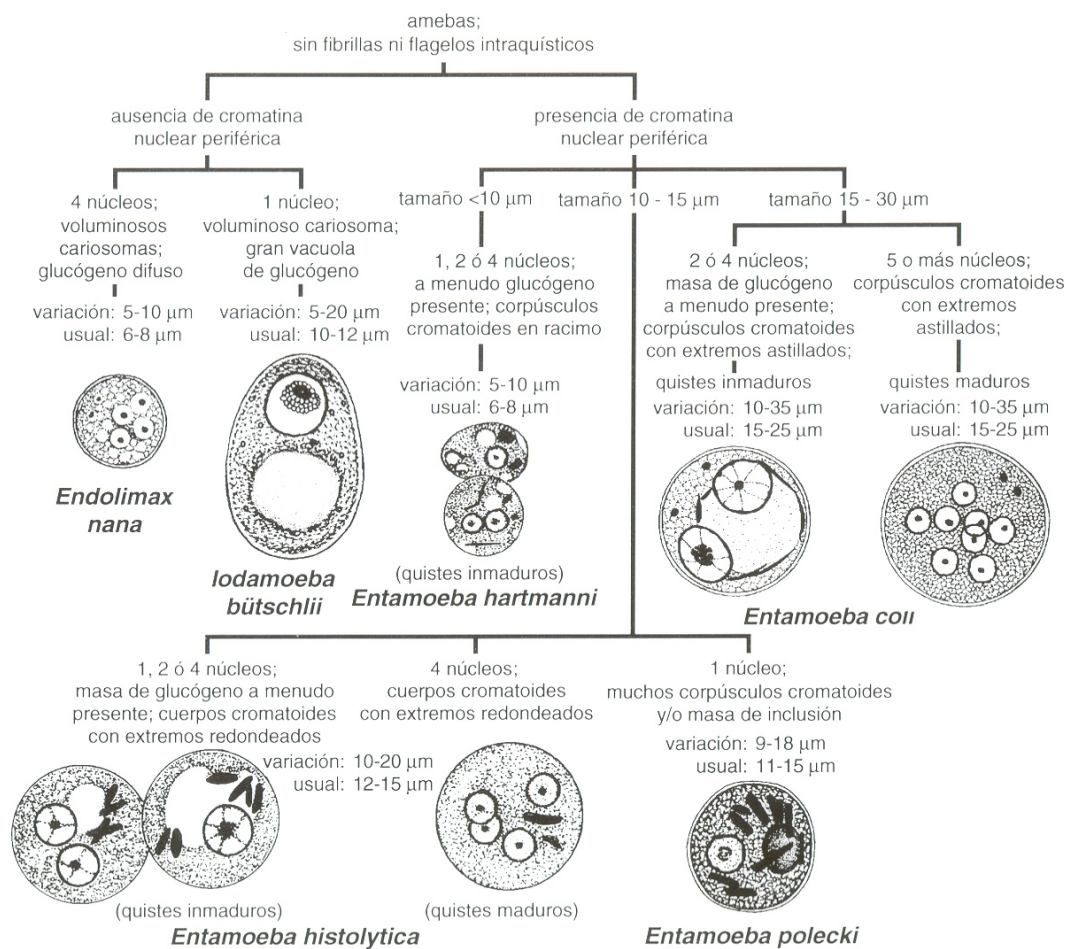
**Figura 4.** Quistes y trofozoítos de distintas especies de *Entamoeba* (Tinción Tricrómica)

Para la diferenciación con otros quistes de amebas, principalmente de *E. hartmanni* y *E. coli*, es importante valorar el número y morfología de núcleos, así como su tamaño, que puede verificarse con la ayuda del micrómetro ocular. En la figura 4, se muestran los quistes y trofozoítos de las especies de *Entamoeba* de interés. También se realizan tinciones permanentes, como la de Negro de Clorazol o Tricrómica, de forma, que el colorante se fija al núcleo y otras estructuras celulares, lo que ayuda a la

diferenciación entre las distintas especies de amebas. En las figuras 5 y 6 se muestran las claves para la identificación de trofozoítos y quistes amebianos en preparaciones teñidas, obtenidas de la OMS (1994).



**Figura 5.** Claves para la identificación de trofozoítos amebianos. OMS (1994)



**Figura 6.** Claves para la identificación de quistes amebianos. OMS (1994)

## 5.2. Cultivo

A diferencia de las bacterias, el cultivo de protozoos intestinales es difícil, caro y complicado de mantener en un laboratorio de diagnóstico. Boeck y Drbohlav, en 1925, fueron los primeros en cultivar *E. histolytica* en un medio difásico utilizando almidón de arroz como fuente de carbohidratos, componente que se sigue empleando en todos los medios xénicos hoy en día. Los cultivos xénicos se definen como aquellos en los que el parásito crece en presencia de bacterias u otras células, para aprovechar la actividad metabólica de éstas y poder utilizar eficazmente los componentes incluidos en el medio de cultivo, a diferencia de los axénicos

que no incluyen actividad metabólica adicional alguna, ya que no incorporan ni células procariotas ni eucariotas.

Se han desarrollado medios difásicos y monofásicos para el cultivo xénico de *E. histolytica*. Los que se utilizan con más frecuencia son el medio difásico de Robinson y el medio monofásico TYSGM-9 (Clark & Diamond 2002).

Diamond en 1961 logró cultivar por primera vez el parásito en un medio axénico. El medio difásico empleado era muy complejo. Por lo que hasta que no se introdujo, en 1968, el medio monofásico TP-S-1 no se utilizó ampliamente el cultivo axénico (Diamond 1968). En 1978, este medio fue superado por el medio TYI-S-33 (Diamond *et al.* 1978) que es el que se emplea actualmente en los laboratorios de referencia.

El cultivo de *E. histolytica* puede realizarse a partir de la muestra de heces, de biopsias intestinales y del aspirado del absceso hepático. La sensibilidad del cultivo de *E. histolytica* para la detección del parásito se aproxima al 50-70% en los laboratorios de referencia (Clark & Diamond 2002). Actualmente, el cultivo no suele utilizarse para el diagnóstico clínico, ya que además de su baja sensibilidad, el tiempo de cultivo es largo. Habitualmente, el parásito tarda en crecer de siete a catorce días. Debe indicarse también que es una técnica muy laboriosa y cara. En ocasiones se observa el inconveniente del sobrecrecimiento bacteriano, fúngico o de otros protozoos en el cultivo, lo que disminuye aún más la eficacia de esta técnica. Por otra parte, la sensibilidad del cultivo es menor que la de las otras técnicas que se han desarrollado en los últimos años. Por lo que debe insistirse en que no se recomienda su uso en los procedimientos diagnósticos de rutina para la detección de *E. histolytica* en los laboratorios asistenciales.

### 5.3. Análisis isoenzimático

Los trabajos pioneros de Sargeant *et al.* (1978) demostraron que el análisis isoenzimático del cultivo de amebas era capaz de diferenciar entre las entonces denominadas *E. histolytica* patógena y *E. histolytica* no patógena. Un zimodema es definido como una población genéticamente diferenciable que comparten el patrón electroforético para varias enzimas. El análisis isoenzimático originalmente implicaba el estudio de cuatro sistemas, enzima málico (ME), fosfoglucomutasa (PGM), glucosa-fosfato-isomerasa (GPI) y hexoquinasa (HK). Este último es el más utilizado actualmente.

De los 20 zimodemas que describió (Sargeant 1987), nueve son de la especie patógena y el resto de la no patógena. Actualmente, según los estudios de Diamond y colaboradores empleando cultivos axénicos, se considera que sólo existen cuatro zimodemas, de los que II, XIV y XIX corresponden a *E. histolytica* y el zimodema I a *E. dispar*. El resto de los patrones enzimáticos descritos anteriormente en cultivos xénicos podían ser el resultado de artefactos, originados por la presencia de bacterias en el medio (Ravdin 2000).

Este método es capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, por lo que se ha considerado la técnica de referencia para el diagnóstico de la amebiasis, hasta que se han desarrollado nuevas herramientas basadas en métodos de biología molecular.

El análisis de zimodemas presenta varias desventajas, entre las que destaca su gran complejidad, su precio elevado y la necesidad de laboratorios con personal cualificado. Además, el tiempo de realización de la técnica es largo, se requiere el establecimiento de las amebas en cultivo y se precisa de una gran cantidad de células para llevar a cabo el análisis de enzimas. El cultivo de amebas no siempre tiene éxito y, además, tiene el inconveniente de que favorece el crecimiento de una especie sobre otra en el caso de infecciones mixtas. Resulta obvio que no es sencillo incorporarlo como técnica rutinaria en los laboratorios asistenciales. Por lo

que el análisis isoenzimático para el estudio de *E. histolytica* ha sido suplantado por los métodos basados en el análisis del ADN del parásito.

#### **5.4. Detección de anticuerpos**

Los ensayos serológicos para la identificación de *E. histolytica* son muy útiles en países desarrollados, donde la infección no es endémica (Weinke *et al.* 1990; Walderich *et al.* 1997). Sin embargo, en áreas donde la infección sí lo es y las personas pueden estar expuestas al parásito, las pruebas serológicas tienen una utilidad limitada, ya que no pueden distinguir entre una infección pasada y una actual, lo que dificulta su diagnóstico (Caballero-Salcedo *et al.* 1994). En cualquier caso, la combinación de la serología con la detección del parásito, por ejemplo con técnicas de PCR, es el mejor abordaje para el diagnóstico de la amebiasis. (Pillai *et al.* 1999).

Se han desarrollado diferentes métodos serológicos como la hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación en látex (AL), inmunolectroforesis (IEF), contralectroforesis (CIE), inmunofluorescencia indirecta (IFI), fijación del complemento (FC) y ensayo inmunoenzimático (ELISA). En la tabla 1 se incluye un resumen de la rentabilidad diagnóstica de las principales técnicas serológicas disponibles en el mercado con los datos de sensibilidad y especificidad para cada una de las técnicas y divididas según los estudios publicados, con la referencia entre paréntesis para facilitar su revisión.

Además de las técnicas comerciales incluidas en la tabla 1, también se utilizan métodos como la FC y la CIE. La FC es un método que aún se utiliza en el diagnóstico serológico de algunas enfermedades infecciosas, pero presenta una menor sensibilidad que las técnicas comerciales en el caso de la amebiasis. Asimismo tiene un mayor coste, por lo que no se utiliza en la mayoría de los laboratorios. La CIE era la técnica que se utilizaba más comúnmente en el pasado. El antígeno HK-9 de *E. histolytica* se enfrenta con el suero del paciente en placas de agarosa al 1%. Algunos trabajos han encontrado sensibilidades superiores con la

técnica de ELISA. Por lo que el ELISA se ha propuesto como alternativa ya que es una técnica rápida, sencilla y sensible (Restrepo *et al.* 1996).

**Tabla 1.** Técnicas serológicas comercializadas para la detección de la amebiasis

Ensayo	Sensibilidad %	Especificidad %	Fabricante
<i>Cellognost-Amoebiasis</i> (HAI)	100 <sup>a</sup>	90.9–100 <sup>a</sup>	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany
<i>Novagnost Entamoeba IgG</i>	> 95 <sup>b</sup>	>95 <sup>b</sup>	NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany
<i>Bichro-Latex Amibe</i>	93.3 (van Doorn 2005)	95.5	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
	98.3 (Robert <i>et al.</i> 1990)	96.1	
<i>I.H.A. Amoebiasis</i>	93.4 (Robert <i>et al.</i> 1990)	97.5	Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France
<i>Amoeba-Spot IF</i>	ND	ND	bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France
<i>Amebiasis Serology microplate ELISA</i>	95 <sup>b</sup>	97 <sup>b</sup>	Light Diagnostics
<i>Amebiasis Serology microwell EIA(HK-9 antigen, axenic)</i>	97.9 (Hira <i>et al.</i> 2001)	94.8	LMD Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA
	92.5 (Shenai <i>et al.</i> 1996)	91.3	
<i>RIDASCREEN Entamoeba</i> (ELISA)	100 <sup>b</sup>	95.6 <sup>b</sup>	R-Biopharma AG, Darmstadt, Germany
	97.7–100 (Knappik <i>et al.</i> 2005)	97.4	

*a* Para títulos  $\geq 1:64$ , 100% sensible y 90.9% específico. Para títulos  $\geq 1:512$ , 100% sensible y 100% específico.

*b* Según datos del fabricante

*c* ND, no disponibles.

Con respecto a la HAI, es un método sencillo de realizar y muestra una elevada especificidad (Hung *et al.* 1999). Sin embargo, la sensibilidad es más baja en pacientes con AHA, porque puede dar falsos negativos en las dos primeras semanas del comienzo de los síntomas (Sanchez-Guillen *et al.* 2002; Sanchez-Guillen *et al.* 2000).

En relación con los ensayos de aglutinación en látex son muy fáciles de llevarlos a cabo, en 10 minutos se obtiene el resultado. En un trabajo publicado recientemente por van Door y colaboradores (2005), la especificidad de una de estas técnicas se situó en el 99.5%. La sensibilidad fue del 92% en los pacientes con absceso hepático, y del 100% en los enfermos con colitis amebiana. Estos resultados son

similares a los publicados con anterioridad (Robert *et al.* 1990; Kraoul *et al.* 1997).

Por otra parte, la detección de anticuerpos utilizando IFI es un método rápido, fiable y reproducible (García *et al.* 1982). En el diagnóstico del AHA, la sensibilidad y especificidad alcanzadas son 93,6%, y 96,7%, respectivamente (Shamsuzzaman *et al.* 2000).

Para terminar, los ensayos de ELISA son los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo, tanto en estudios epidemiológicos como en el diagnóstico de pacientes con amebiasis (Knappik *et al.* 2005). La detección de anticuerpos en suero por ELISA es una herramienta muy valiosa en el caso del AHA. La sensibilidad de estos ensayos serológicos en pacientes con AHA se ha situado entorno al 100% en muchas de las series publicadas (Zengzhu *et al.* 1999). En un estudio realizado con un ELISA en una zona endémica en Vietnam, se observó que más del 80% de los individuos infectados con *E. histolytica*, incluso los portadores asintomáticos, tenían anticuerpos frente a la ameba en suero. Estos resultados fueron confirmados por una técnica de PCR en tiempo real (Blessman *et al.* 2002a; Blessman *et al.* 2002b).

### **5.5. Detección de antígeno en heces (Coproantígeno)**

En los últimos años, se han desarrollado otra clase de herramientas diagnósticas. Estas técnicas se basan en la detección de antígenos en vez de anticuerpos en muestras clínicas.

Se han desarrollado ensayos de ELISA para la detección de antígenos en muestras de heces. Los anticuerpos monoclonales son la base de los ELISA de captura que se han comercializado para realizar el diagnóstico de *E. histolytica*. Estos tests de ELISA utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos específicos de la lectina de galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAC) de *E. histolytica*, como los epítomos 3, 4, 5 y 6 (Petri, Jr. *et al.* 1990) (*E. histolytica II*; TechLab, Blacksburg, VA) o anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno rico en serina de

*E. histolytica* (Optimum S kit; Mersin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany). Esta técnica es muy sencilla y rápida de realizar, pero tienen el inconveniente de que el antígeno se desnaturaliza por los conservantes, por lo que sólo se pueden efectuar en muestras de heces recién emitidas o congeladas. La evaluación de estos ensayos en un estudio realizado en Bangladesh demuestra que son más sensibles que la microscopía y que el cultivo, para la detección de *E. histolytica* en la muestra de heces de pacientes con colitis amebiana, así como de portadores asintomáticos (Haque *et al.* 1995; Haque *et al.* 1998; Haque *et al.* 1997).

En contraste, otros estudios no han obtenido resultados similares. En este sentido, Gonin y Trudel (2002) encuentran que el ELISA presenta una sensibilidad menor del que la técnica de PCR en la diferenciación de *E. histolytica*/*E. dispar*. En otro estudio comparativo, Mirelman y colaboradores (1997) observaron que la técnica de PCR tiene una sensibilidad 100 veces superior que el ELISA en la detección de *E. histolytica*. En otro trabajo en el que comparan la eficacia del ELISA de antígeno con la rentabilidad del cultivo y posterior estudio de zimodemas se concluyó que la rentabilidad más baja se observaba con la técnica de ELISA (Gatti *et al.* 2002). Además, otros investigadores han detectado problemas de falsos positivos por reactividad cruzada con *E. dispar* (Furrows *et al.* 2004; Visser *et al.* 2006). Por tanto, la técnica de ELISA tiene una utilidad limitada, por lo que en países desarrollados es cuestionable su uso, ya que deben utilizarse técnicas más fiables como las basadas en la biología molecular.

Por otra parte, métodos antigénicos para la detección de la adhesina de *E. histolytica*, se han empleado en otras muestras, como el suero y el pus de los enfermos con absceso hepático. Un trabajo analizó el *kit* comercial de TechLab *E. histolytica II* en este tipo de muestras con una rentabilidad muy elevada, que no ha sido confirmada en otros trabajos posteriores (Haque *et al.* 2000).

También se han comercializado ensayos de inmunocromatografía, TPP (Biosite Diagnostic Inc., San Diego, CA), que detectan simultáneamente

antígenos de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica*/*E. dispar* en muestras de heces recién emitidas o congeladas. Algunos investigadores han encontrado una elevada sensibilidad y especificidad al comparar el kit TPP con la microscopía para la detección de *E. histolytica*/*E. dispar* (García *et al.* 2000; Sharp *et al.* 2001). Sin embargo, otros autores han comunicado recientemente una baja sensibilidad de este ensayo (Leiva *et al.* 2006). El protocolo es muy sencillo de realizar, pero tiene el inconveniente de que al no diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* no puede utilizarse en el diagnóstico de laboratorio de la amebiasis. Además, un inconveniente adicional es que la muestra de heces debe ser reciente y, si no es posible, se debe congelar hasta la realización del ensayo.

## **5.6. Análisis de ADN**

Las técnicas basadas en el análisis del ADN, como la PCR, han revolucionado el diagnóstico de la amebiasis, ya que presentan una elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en países tropicales y subtropicales donde la amebiasis presenta un problema de salud considerable, el diagnóstico se sigue realizando por el examen microscópico, ya que estas nuevas técnicas de PCR son más caras y necesitan equipos especializados y personal cualificado en ensayos moleculares.

Uno de los principales problemas que tenía el diagnóstico molecular de los patógenos intestinales era el relacionado con la extracción de ADN, ya que las heces es la muestra más compleja para realizar una técnica de PCR debido a la presencia de sustancias inhibidoras, como hemoglobina, bilirrubina, sales biliares, pectinas y carbohidratos, que se extraen junto con el ADN del parásito y disminuyen la sensibilidad de la técnica. Por tanto, la optimización del método de extracción de ADN a partir de las heces es crucial para el éxito en los estudios con protocolos de PCR. Recientemente, han sido desarrollados métodos de aislamiento de ADN de muestras de heces, los cuales han incrementado la sensibilidad de los ensayos de PCR ya que eliminan los inhibidores, bien durante el proceso

de extracción de ADN, o purificando el ADN previamente extraído, utilizando compuestos quelantes y/o columnas de purificación. Debe destacarse, que el equipo comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) es el método de extracción de ADN de muestras fecales más utilizado actualmente en los laboratorios de investigación clínica (Blessmann *et al.* 2002; Roy *et al.* 2005; Gonin & Trudel 2003)

Las técnicas basadas en la PCR se consideran en la actualidad los métodos de elección para el diagnóstico clínico y estudios epidemiológicos de la amebiasis en países desarrollados (Mirelman *et al.* 1997). Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda utilizarlas, sustituyendo los métodos clásicos.

Hay que destacar que las técnicas de PCR, presentan una sensibilidad 100 veces mayor que la detección de antígeno mediante los kits comerciales de ELISA, descritos en la sección anterior (Mirelman *et al.* 1997). Además, las técnicas de PCR tienen la capacidad de discriminar sin limitaciones entre las dos especies de amebas pertenecientes al complejo *E. histolytica/E. dispar*.

Otra ventaja de estas técnicas moleculares es que se pueden utilizar para la detección de *E. histolytica* en una gran variedad de muestras clínicas como por ejemplo, heces, pus del absceso hepático, orina, sangre y biopsias (Khan *et al.* 2006; Solaymani-Mohammadi *et al.* 2006a; Zengzhu *et al.* 1999; Zaman *et al.* 2000; Parija & Khairnar 2007). También se pueden utilizar muestras de heces en conservante, pero hay que resaltar que el formol puede tener un efecto inhibitorio de la técnica de PCR. Ramos y colaboradores (1999) describen como el efecto inhibitorio de la formalina está directamente relacionado con el tiempo que permanecen las heces en el conservante. En sus trabajos demuestran que a partir del segundo día se produce una disminución de la sensibilidad de las técnicas de PCR. Por el contrario, un grupo de investigadores, Paglia & Visca (2004), no encuentran relación entre el tiempo de conservación de la muestra de heces en formalina y la inhibición de la técnica de PCR. En su trabajo obtienen los mismos resultados de amplificación de *E. dispar* por

la técnica de PCR en las heces conservadas en formalina durante 1, 7, 30 y 90 días.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos de PCR y se han utilizado diferentes genes como diana para el diagnóstico y diferenciación de las dos especies de amebas. Las diferencias detectadas en el gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (SSUrDNA) entre *E. histolytica* y *E. dispar* (Clark & Diamond 1991a; Clark & Diamond 1992; Cruz-Reyes *et al.* 1992; Que & Reed 1991) han hecho que la mayoría de los métodos de PCR publicados amplifiquen regiones del SSUrDNA del episoma (Verweij *et al.* 2000; Evangelopoulos *et al.* 2000; Nunez *et al.* 2001; Heckendorn *et al.* 2002; Moran *et al.* 2005; Clark & Diamond 1993). Otra ventaja de la diana elegida es que este gen tiene un elevado número de copias (Bhattacharya *et al.* 1989), lo que proporciona un aumento de sensibilidad a la técnica.

Otros investigadores han desarrollado métodos de PCR utilizando como diana otros genes, como el gen que codifica para el antígeno de superficie de 125-KDa (Tannich & Burchard 1991; Edman *et al.* 1990) y el gen que codifica para el antígeno de 29-Kda/30-Kda (Tachibana *et al.* 1991; Rivera *et al.* 1996). También se ha descrito una PCR colorimétrica, que amplifica el ADN extracromosómico circular. Este método presenta la ventaja de que el producto de amplificación se detecta utilizando sondas específicas, por lo que la lectura se realiza en microplacas sin tener que utilizar geles con bromuro de etidio (BrEt) (Aguirre *et al.* 1997; Aguirre *et al.* 1995). Recientemente, se ha publicado un ensayo de PCR utilizando como diana el gen de la hemolisina de *E. histolytica* (Zindrou *et al.* 2001).

Con el fin de incrementar la sensibilidad de los ensayos de PCR, se han desarrollado protocolos de *nested*-PCR para la detección simultánea y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, utilizando el ADN extraído de las muestras de heces con examen microscópico positivo (Evangelopoulos *et al.* 2000; Haque *et al.* 1998; Hung *et al.* 2005). Estas técnicas ha demostrado tener una sensibilidad y una especificidad del 94% y del 100%, respectivamente (Nunez *et al.* 2001).

En el diagnóstico del AHA, se han usado distintos métodos de PCR para la detección del ADN de *E. histolytica* en el pus del absceso hepático. Tachibana y colaboradores (1992) consiguieron una sensibilidad del 100%. Resultados similares han sido reportados por Zindrou y colaboradores (2001). Zaman y colaboradores (2000) en su trabajo efectuaron la técnica de PCR directamente del pus del absceso, sin un tratamiento previo de las muestras, logrando una elevada sensibilidad. Finalmente, se ha realizado un estudio (Parija & Khairnar 2007) en el que se utiliza la muestra de orina para la detección de *E. histolytica* en pacientes con amebiasis extraintestinal.

La PCR en tiempo real es una nueva y atractiva metodología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Recientemente se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real para el diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* (Blessmann *et al.* 2002; Roy *et al.* 2005). Esta clase de PCR se basa en los métodos convencionales de PCR, pero incorporando la novedad de la detección cuantitativa del producto amplificado, mediante fluorescencia. En un trabajo en el que se compara la PCR convencional con una PCR en tiempo real para la detección de *E. histolytica* y *E. dispar*, se obtuvo la misma sensibilidad con las dos técnicas (Calderaro *et al.* 2006) Sin embargo, Roy y colaboradores (2005) obtienen una sensibilidad superior con la técnica PCR en tiempo real, resultados que se han visto confirmados por otros trabajos más recientes (Qvarnstrom *et al.* 2005).

También se han publicado ensayos de PCR en tiempo real para la detección simultánea de *E. histolytica*, *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium spp.*, con una excelente sensibilidad y especificidad (Verweij *et al.* 2004; Haque *et al.* 2007). Por lo que estos ensayos son una alternativa muy interesante, que podría ser introducida en algunos laboratorios asistenciales, para la detección del ADN de estos parásitos, en casos de enfermos con diarrea (Ten Hove *et al.* 2007).

### 5.7. Métodos de caracterización

Las infecciones por *E. histolytica* son muy variables desde el punto de vista clínico. Muchos enfermos no desarrollan la enfermedad, siendo portadores asintomáticos durante muchos años. En otras ocasiones, se producen diarreas y otros síntomas intestinales, que pueden variar desde cuadros leves a casos muy intensos, que pueden poner en peligro la vida del paciente. Por último, en algunos pacientes se producen cuadros extraintestinales, que pueden llegar a causar AHA y otras complicaciones. Los factores que determinan la evolución de la infección por *E. histolytica* son desconocidos. Existen varias posibilidades, ya que pueden depender de la cepa infecciosa, del hospedador o ser una combinación de ambos factores, ya que, probablemente, sea una interacción entre factores genéticos, inmunológicos, del estado nutricional, de la flora entérica, del hospedador y de la existencia de distintos genotipos del parásito que producen la enfermedad

Una de las posibilidades mencionadas que más se han analizado recientemente es el genotipo del parásito. Por lo que se han realizado estudios moleculares para determinar si algunas cepas de *E. histolytica* tienen mayor probabilidad que otras de producir enfermedad invasora. En relación con esto, parece probado que deben desarrollarse herramientas para estudiar la diversidad del parásito. En este sentido se han puesto a punto técnicas de PCR para detectar variaciones en el ADN de las distintas cepas de *E. histolytica*. Para determinar la variabilidad se han estudiado secuencias diana codificantes y no codificantes de los ácidos nucleicos.

## **Proteínas**

Dos genes de *E. histolytica* han mostrado polimorfismo en la región codificante, el de la proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP) y el de la quitinasa.

**SREHP**, fue descrita como un antígeno de superficie y se investigó como un candidato a vacuna (Stanley, Jr. *et al.* 1990; Bruchhaus & Tannich 1993). Clark y Diamond (1993) detectaron variaciones en este gen en cepas de *E. histolytica*, mantenidas en cultivo axénico, procedentes de diferentes zonas geográficas.

Recientemente se ha descrito una *nested* SREHP-PCR para investigar la diversidad de *E. histolytica* usando ADN extraído de muestras de heces o del pus del absceso sin necesidad de cultivar el parásito (Ayeh-Kumi *et al.* 2001), tabla 2. Los investigadores encontraron diferencias en el gen SREHP entre las cepas que causan amebiasis intestinal de las causantes de absceso hepático mediante la *nested* SREHP-PCR. Sin embargo, en un estudio realizado en Japón no se determinó una relación significativa entre el genotipo y las presentaciones clínicas, como diarrea y absceso hepático (Haghighi *et al.* 2002). Los autores proponen que la tipificación molecular de *E. histolytica* puede ayudar a determinar el origen geográfico y la ruta de transmisión del parásito. Otro trabajo llevado a cabo en Georgia (Simonishvili *et al.* 2005), con cepas de *E. histolytica* aisladas de pacientes de Tbilisi donde se produjo un brote de amebiasis, revelaron un alto grado de polimorfismo.

**Quitinasa**, ha sido utilizada con menos frecuencia. La mayoría de los estudios se han basado más en la secuenciación de los productos de la PCR que en la variación del tamaño de los mismos. La quitinasa también está presente en *E. dispar* y presenta polimorfismo (Ghosh *et al.* 2000).

**Tabla 2.** *Primers* usados para la caracterización de genes polimórficos de *E. histolytica* y *E. dispar*

Gen	Primer	Secuencia (5'- 3')	Referencia
<b>SREHP</b>	SREHP5	GCTAGTCCTGAAAAGCTTGAAGAAGCTG	(Ayeh-Kumi et al 2001)
	SREPH3	GGACTTGATGCAGCATCAAGGT	
	nSREPH5	TATTATTATCGTTATCTGAACTACTTCCTG	
	nSREPH3	TGAAGATAATGAAGATGATGAAGATG	
<b>Quitinasa</b> de <i>E. histolytica</i>	EHF	GGAACACCAGGTAAATGTATA	Ghosh <i>et al</i> (2000)
	EHR	TCTGTATTGTGCCCAATT	
<b>Quitinasa</b> de <i>E. dispar</i>	EDF	GGAACACCAGGTAAATGCCTT	
	EDR	TCTGTATTGTGCCCAATT	
<b>Locus 1-2</b>	R1	CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT	(Zaki & Clark 2001)
	R2	CTTACACCCCATTAACAAT	
<i>E. histolytica</i>	Hsp1	AGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT	
	Hsp2	ATTAACAATAAAGAGGGGAGGT	
<i>E. dispar</i>	Dsp1	TTGAAGAGTTCACCTTTTTATACTATA	
	Dsp2	TAACAATAAAGGGGAGGG	
<b>Locus 5-6</b>	R5	CTAAAGCCCCCTTCTCTATAATT	(Zaki & Clark 2001)
	R6	CTCAGTCGGTAGAGCATGGT	
<i>E. histolytica</i>	Hsp5	CTATAATTTATATATTATTCTCTTTGAGA	
	Hsp6	CATTGTTTTTAAAGTTAAAGACG	
<i>E. dispar</i>	Dsp5	CTATACTATATTCTTTTTATGTA CTCTCC	
	Dsp6	CTGAGAGCATTGTTTTTAAAGAA	

**Locus ligados al ARNt (tRNA-linked Loci)**

En algunos patógenos eucariotas los microsatélites se han utilizado como diana para detectar diversidad. *E. histolytica* carece de microsatélites pero contiene STRs (repeticiones cortas en tandem), de complejidad mayor que los tradicionales microsatélites. Los locus que contienen STR están ligados a genes ARNt. Además, los STRs se caracterizan por ser ricos en A (adenina) y T (timina) y varían en la secuencia y en el número de repeticiones entre las distintas cepas (Zaki & Clark 2001).

Dos locus STR, locus 1-2 y locus 5-6, han mostrado polimorfismo para *E. histolytica* y *E. dispar*, lo que hace que sean un posible marcador molecular para investigar la epidemiología de estas dos especies de amebas (Zaki & Clark 2001). Se ha descrito un método de PCR para la diferenciación simultánea y caracterización de *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que se han diseñado *primers* específicos para cada una de las especies (Zaki *et al.* 2002), tabla 2. También se ha realizado con éxito la tipificación molecular directamente de muestras de heces, cuando el ADN fue extraído con el Kit comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)* (Zaki *et al.* 2003b).

Posteriormente, se ha completado un análisis exhaustivo del polimorfismo de los STRs ligados al ARNt y el resultado ha sido la identificación de seis secuencias polimórficas (Ali *et al.* 2005). Se ha desarrollado un método de PCR para el genotipado de *E. histolytica* basado en la variación de los STRs. Se han diseñado seis parejas de *primers* especie-específicos que diferencian entre *E. histolytica* y *E. dispar*, de esta forma se evitan los problemas en la identificación de las infecciones mixta, tabla 3. El polimorfismo intraespecie se detecta por el tamaño de los productos de PCR obtenidos, sin necesidad de posteriores análisis. La utilización de *nested* PCR alcanza una rentabilidad de más del 99% para todos los STRs, independientemente del origen de la muestra analizada (células de cultivo, pus del absceso hepático y heces).

Más recientemente, este método se ha utilizado como herramienta para investigar la identificación de genotipos del parásito en pacientes infectados con *E. histolytica* pero con diferente clínica. Se incluyeron en el estudio individuos asintomáticos, con diarrea o absceso hepático. De esta manera, se detectó un alto grado de polimorfismo en *E. histolytica*, y se encontró diferencias significativas en el genotipo presentado por las muestras de los tres grupos analizados, lo que sugiere que el genoma del parásito influye en la evolución de la infección (Ali *et al.* 2007).

**Tabla 3.** *Primers* usados para el genotipado de *E. histolytica* y *E. dispar*

<i>Primer</i> <sup>a</sup>	Secuencia (5' – 3')	TA(°C) <sup>c</sup>
Primera amplificación <sup>b</sup>		
A-L5	GGATCGATACCCCTCATCTCCA	64
A-L3	CGCATCTTGGGATAGCCGAG	
D-A5 (R1) <sup>d</sup>	CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT	56
D-A3 (R2) <sup>d</sup>	GCTACACCCCATTAACAAT	
N-K5	CGAACGGCTGTTAACCGTTA	55
N-K3	TTCCTAGCTCAGTCGGTAGA	
R-R5	AGCATCAGCCTTCTAAGCTG	55
R-R3	CTTCCGACTGAGCTAACAAG	
STGA-D5	CTCTGGATGCGTAGGTTCAA	58
STGA-D3	GTATCTTCGCCTGTCACGTG	
S-Q5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	56
S-Q3	GAGATTCTGGTTCTTAGGACCC	
Segunda amplificación específica para <i>E. histolytica</i>		
AL-H5	CATCTCCATTATTATCTAGATATCCT TTATTACT	57
AL-C	GGCACGAATGCTTTGATATATAA	
DA-H5 (Hsp1) <sup>d</sup>	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT	50
DA-H3 (Hsp2) <sup>d</sup>	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	
NK2-H5	GAAGCGTCTTTTTACTATTAGTG	59
NK2-H3	GGCGTATTTTTAGAATAGGATAAG	
RR-H5	GCGCCTTTTTATTCAATATACTCC	57
RR-H3	GGATGAAGATATCTTCACAGGG	
STGAD-H5	AAATCCTGCCACTGTCGTAA	58
STGAD-H3	AATCCCCGTTGAAGAGTTCT	
SQ5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	55
SQ-H3	GTGGGACCACTTTTTATACCTA	
Segunda amplificación específica para <i>E. dispar</i>		
AL-D5	CATCTCCATTATTATGTATCTATTTA TCTATTTA	60
AL-C	GGCACGAATGCTTTGATATATAA	
DA-D5 (Dsp1) <sup>d</sup>	TTGAAGAGTTCACTTTTTATAC TATA	50
DA-D3 (Dsp2) <sup>d</sup>	TAACAATAAAGGGGAGGG	
NK-D5	GCGGAAGCGTCTTTTTACTATT ATTA	58
NK-D3	GGCGTATTTTTATAATAAGAATAG GTGG	
RR-D5	CATGAGGCGCCTTTTTATCA	58
RR-D3	AGGGGATGATGATATTGAACAC ACTC	
STGAD-D5	AAATCCTGCCACTGTCGTAC	63
STGAD-D3	AATCCCCGTTGAAGAGTTCA	
SQ-D5	AGCATAGGTGTATAGGTGTTAGG	53
SQ-D3	GGTGGGACCATATTTTATACTTC	

*a* H, *E. histolytica*; D, *E. dispar*;

*b* Los *primers* tRNA-específicos amplifican los STRs de *E. histolytica* y *E. dispar*.

*c* TA, temperatura de anillamiento.

*d* Estos *primers* son los descritos previamente para el locus 1-2.

***OBJETIVOS***

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La amebiasis es una infección emergente en España. El diagnóstico de esta parasitosis se basa en los métodos microbiológicos tradicionales, que tienen una sensibilidad baja y que no permiten distinguir entre *E. histolytica* y otras especies comensales de amebas, como *E. dispar*. Las técnicas diagnósticas de detección de ácidos nucleicos han mostrado una gran utilidad en la caracterización de diversas infecciones.

Este trabajo intenta demostrar que puede mejorarse el diagnóstico de la amebiasis, mediante el diseño y la validación de técnicas moleculares para su posterior aplicación clínica y epidemiológica. El desarrollo experimental del trabajo se realizó según los siguientes objetivos.

### Objetivos

**1. Desarrollo y validación de una técnica de PCR para el diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*.**

**2. Aplicación clínica de la técnica de PCR:**

2.1 Diagnóstico de *E. histolytica* en pacientes con amebiasis extraintestinal.

2.2 Diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces.

**3. Caracterización genotípica de las cepas de *E. histolytica* de los pacientes con amebiasis.**

***Material y Métodos***

## 1. Desarrollo y validación de una técnica de PCR con aplicación para el diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*

### 1.1. Optimización de las condiciones de trabajo para una *nested-PCR*

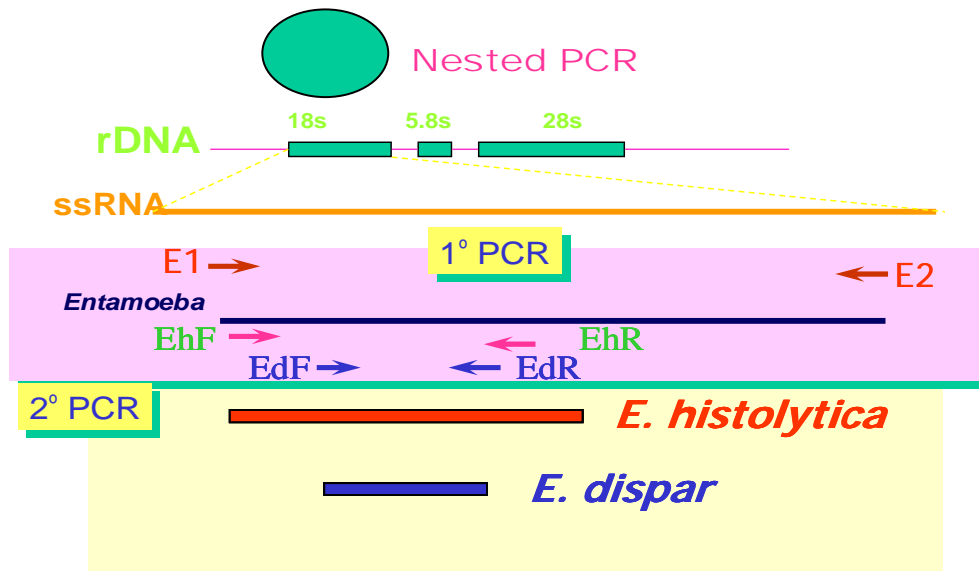
El objetivo fue desarrollar una *nested-PCR*, ya que este tipo de reacción permite un incremento de la sensibilidad (al contar con dos pasos de amplificación) y de la especificidad (al utilizar dos parejas de *primers* distintos en cada paso de amplificación). Se seleccionó como diana el gen SSUrADN del episoma (gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma), que se encuentra repetido un elevado número de veces en el genoma de *Entamoeba*.

Se utilizaron los *primers* previamente diseñados por Evangelopoulos *et al.* (2000). Los *primers* E1 y E2 permiten amplificar un fragmento común a *E. histolytica* y *E. dispar* de 1076 pb en la primera reacción de PCR. En la segunda reacción se emplean unos *primers* específicos de *E. histolytica*, Eh-l y Eh-r, obteniendo un producto de amplificación de 427 pb y otros *primers* específicos para *E. dispar*, Ed-l y Ed-r, que rinden un producto de amplificación de 195 pb, tabla 4.

**Tabla 4.** Secuencias de los *primers* utilizados en la PCR

Denominación	Secuencia	Pares de bases
E1	TGC TGT GAT TAA AAC GCT	1076 pb
E2	TTA ACT ATT TCA ATC TCG G	
Eh-l	ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A	427 pb
Eh-r	CAG ATC TGA AAA CAA TGC TTC TCT	
Ed-l	GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A	195 pb
Ed-r	ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC	

En la figura 7 se incluye un esquema de la *nested*-PCR empleada en nuestro trabajo.



**Figura 7.** Esquema de la *nested*-PCR

El ADN control fue cedido por cortesía del Dr. Graham Clark (The London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres, Inglaterra) obtenido a partir del cultivo axénico de las cepas de *E. histolytica* HM-1:IMSS, 200:NIH, H-303:NIH, IULA:1092:2, IULA0592:1 y de *E. dispar* SAW 760.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando reactivos de BIOTOOLS (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., España):

-Tampón de reacción 10x: Tris HCl 75mM (pH 9.0), KCl 50 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20mM.

-  $\text{MgCl}_2$  : 50 mM.

- dNTP<sub>s</sub>: dATP, dTTP, dCTP, dGTP 10mM, en agua ultrapura pH 7.0.

-*Tth* ADN polimerasa: 1 U/ $\mu$ l en tampón de almacenamiento.

Los primers usados fueron sintetizados por SIGMA-GENOSYS, Europa.

El termociclador empleado fue el Gen Amp 2700 PCR System (Applied Biosystems).

Los productos de PCR se visualizaron tras someterlos a electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (Tris-borato 0.04 mM, EDTA 0.001mM pH 8.0) y tinción con BrEt (1µl de solución 10mg/ml por cada ml de gel) en una cubeta de electroforesis horizontal SUB-CELL<sup>R</sup> GT (BIO RAD) y transiluminación con UV, GEL Doc 2000 (BIO RAD) utilizando el programa Quantity One 4.4.0 (BIO RAD).

#### 1.1.1 Selección de la concentración de MgCl<sub>2</sub>

Se prepararon una serie de reacciones con un rango de concentraciones de MgCl<sub>2</sub> entre 1.0 y 3.0 mM, a intervalos de 0.5 mM.

#### 1.1.2 Selección de la concentración de primers y Temperatura (T<sup>a</sup>) de reacción

Para ajustar la concentración final de *primers* en cada PCR se realizó una serie de reacciones con un rango de concentraciones entre 10 y 30 pmol, con intervalos de 2.5 pmol. Para la selección de la T<sup>a</sup>, ensayamos la descrita por Evangelopoulos *et al.* (2000).

#### 1.1.3 Selección del número de ciclos de amplificación

Establecidos los parámetros anteriores, se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que únicamente se alteró el número de ciclos de amplificación, probándose un rango entre 30 y 45 ciclos con intervalos de 5 ciclos.

#### 1.1.4 Selección del volumen del producto de PCR de la primera reacción a utilizar en la segunda reacción

El último paso consistió en definir qué cantidad del producto de la primera PCR debía usarse como ADN molde en la segunda PCR. Se preparó una dilución 1/50 del primer producto de PCR. Se utilizó 5 µl del producto de la primera PCR y 5 µl de la dilución 1/50.

#### 1.1.5 Selección de las condiciones de la segunda reacción de PCR

Una vez quedaron establecidos todos los parámetros para ambas PCRs, se probó a introducir juntos los *primers* de las dos especies de amebas en la segunda reacción de PCR (*multiplex PCR*), o realizar por separado una reacción de PCR para cada una de las especies.

### **1.2. Determinación de la sensibilidad de la *nested-PCR* con ADN de *E. histolytica* y *E. dispar* procedente de cultivo axénico**

Para evaluar la cantidad mínima de parásitos que se pueden detectar con la *nested PCR* se preparó unas diluciones de ADN de *E. histolytica* y *E. dispar*, ensayándose las cantidades correspondientes a 100, 10, 1, 0.1, 0.001, 0.0001 parásitos.

En paralelo se realizaron las mismas pruebas pero incluyendo 5 µl de ADN extraído de una muestra de heces negativa a *E. histolytica* y *E. dispar*, para comprobar si el aumento de ADN extraño puede disminuir la sensibilidad de la PCR.

### **1.3. Estudio de especificidad con otros parásitos**

Se determinó la especificidad de la PCR con ADN de los siguientes parásitos extraídos de heces humanas: *E. coli*, *E. hartmanni*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Ciclospora cayetanensis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*.

#### **1.4. Elección del método de extracción de ADN a partir de muestras biológicas**

Para determinar el método idóneo de aislamiento de ADN en muestras de heces y en el material del absceso hepático, se probaron dos métodos de extracción de ADN.

Se procesaron 10 muestras de heces, en las que se habían observado por microscopía quistes de *E. histolytica*/*E. dispar*. Las muestras se mantuvieron conservadas a  $-20^{\circ}$  C hasta la realización de la extracción de ADN. También se llevó a cabo la extracción, del material obtenido por punción-aspiración del absceso hepático de tres pacientes con serología positiva para *E. histolytica*.

##### **1.4.1. Extracción de ADN con tiocianato de guanidina**

El primer método probado fue la extracción con tiocianato de guanidina (Casas *et al.* 1995). Las muestras de heces fueron sometidas a tratamiento previo, con el fin de eliminar posibles restos de alimentos. Se cogieron 1g de heces y se introdujeron en un tubo con filtro (BIOSEPAR). Se resuspendieron en 2 ml de buffer fosfato salino 1X (PBS) y se homogenizaron bien con el vortex. Se filtraron para eliminar las partículas gruesas. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante del sedimento. El sedimento se resuspendió en 400  $\mu$ l de PBS. Se utilizó 200  $\mu$ l para la extracción con tiocianato de guanidina y se congeló el resto.

La extracción con tiocianato de guanidina se realizó a partir de 200  $\mu$ l del material del absceso y 200  $\mu$ l del sedimento de las heces filtradas. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en 600  $\mu$ l de tampón de lisis de tiocianato de guanidina (Sigma). Se añadió 120  $\mu$ l de acetato potásico 8M y se mantuvo en hielo, durante 15 a 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 600  $\mu$ l de isopropanol ( $-20^{\circ}$ C), haciendo precipitar a los ácidos nucleicos. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm a  $4^{\circ}$ C. Después de la centrifugación, el

sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 1.500 µl de etanol al 70% (-20°C). Una vez realizada una centrifugación durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C, el etanol se eliminó y el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen de 100 µl de agua estéril.

#### 1.4.2. Extracción de ADN con un método comercial

El segundo método de extracción de ADN probado fue el *Kit* de extracción comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) para las muestras de heces y para las muestras de absceso hepático se utilizó *QIAamp<sup>R</sup> DNA Mini Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo seguido para las muestras de heces fue el descrito por el fabricante con alguna modificación. Se pesó en un tubo de 2 ml de 180 a 220 mg de heces congeladas. Se añadió 1,4 ml de ASL buffer y se homogenizó completamente con ayuda del vortex. La suspensión se calentó 5 minutos a 90°C para romper la pared del quiste de la ameba. Pasado este tiempo se volvió a dar un pulso en el vortex. Se centrifugó un minuto a 13.000 rpm. En un tubo de 2 ml con una pastilla de *Inhibitex* se añade 1,2 ml del sobrenadante y se desecha el pelet. Se homogeniza con ayuda del vortex hasta su disolución. Se incuba 3 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Se centrifuga 3 minutos a 13000 rpm. Se echa el sobrenadante en un nuevo tubo de 1,5 ml. Se vuelve a centrifugar 3 minutos a 13000 rpm. Se añade 15 µl de QIAGEN *Protease* (proteínasa K) en un tubo de 1,5 ml; posteriormente y en el mismo tubo se añadieron 200 µl del sobrenadante. En el mismo tubo se incorporaron 200 µl de la solución AL, homogenizándose mediante agitación mecánica durante 15 segundos. Tras incubar 10 minutos a 56°C, se centrifugó durante 15 segundos a 13.000 rpm. Se añadieron 200 µl de etanol (96-100%) y se agitó mecánicamente durante 15 segundos. Se procedió a dar un pulso para ayudar a que las gotas de la tapa cayeran al interior. Con cuidado, se pasó todo el contenido del tubo de 1,5 ml a la columna de extracción, la cual fue centrifugada a 8.000 rpm durante un minuto. Tras la centrifugación se pasó la columna a un tubo nuevo, volviéndose a realizar otra

centrifugación para asegurarnos que todo el etanol había sido eliminado, tras este paso el ADN estaba unido a la membrana de sílice de la columna, que en presencia de gran concentración de sales retiene el ADN. Finalmente, se añadieron las soluciones de lavado para eliminar el exceso de sales, purificando el ADN. Primero se añadieron 500 µl de la solución AW1 a la columna y se centrifugó a 8.000 rpm durante un minuto. Se pasó la columna a un nuevo tubo y se le añadió 500 µl de la solución AW2, centrifugándose a 13.000 rpm durante tres minutos. Tras esta centrifugación se realizó otra a 13.000 rpm durante un minuto, para asegurar la eliminación completa de la solución AW2. Por último, se colocó la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y se le añadió 200 µl de agua destilada, se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8.000 rpm durante un minuto, recuperando así el ADN con el eluido.

### **1.5. Elección de las condiciones para el envío de las muestras de heces**

Se hizo un estudio preliminar para establecer si las condiciones de conservación y envío de las muestras de heces podían tener alguna influencia en los resultados de la técnicas de PCR.

Se utilizaron un total de 59 heces, conservadas de tres formas distintas: (i) 10 en formalina al 10 %, (ii) 39 muestras conservadas en SAF (solución de acetato de sodio, ácido acético y formol), y (iii) 10 frescas congeladas. Todas las muestras fueron obtenidas de pacientes en los que en el examen microscópico se observaron quistes compatibles con el complejo *E. histolytica/E. dispar*. Las muestras de heces incluidas en conservante, formalina al 10 % o SAF, fueron lavadas en el laboratorio con la finalidad de eliminar el conservante. Para esto, las muestras se trataron con PBS y se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos, repitiéndose el proceso tres veces. El sedimento recuperado se utilizó para la extracción de ADN.

## **2. Aplicación Clínica de la PCR**

### **2.1. Enfermos**

#### **2.1.1. Diagnóstico de *E. histolytica* en pacientes con amebiasis extraintestinal**

Se estudiaron 15 enfermos con absceso hepático amebiano (AHA) diagnosticados por técnicas serológicas y de imagen. Se analizaron las variables demográficas, epidemiológicas y clínicas.

En 13 pacientes se analizó el material obtenido por punción-aspiración del absceso, y en cuatro de éstos también se procesó una muestra de heces. En dos pacientes sólo se realizó el estudio en las heces, ya que no se llevó a cabo punción del absceso hepático.

Para realizar el estudio de especificidad se analizó el material obtenido por punción-aspiración de 14 pacientes con un diagnóstico de absceso hepático no amebiano.

En todos los pacientes se hizo la detección de anticuerpos frente a *E. histolytica*.

#### **2.1.2. Diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces**

Se procesaron 414 muestras de heces, correspondientes a 302 pacientes. Estas muestras fueron agrupadas según el resultado del examen microscópico (ver tabla 5). Hubo un gran número de muestras en las que no se pudo realizar el diagnóstico diferencial entre las distintas especies de amebas, ya que llegaron a nuestro laboratorio congeladas. En muchos hospitales no disponen de un micrómetro en el ocular y es muy difícil poder precisar la especie de *Entamoeba*.

**Tabla 5.** Muestras de heces analizadas

Resultado examen microscópico	Pacientes	Nº heces
A. Quistes compatibles con <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	76	95
B. Quistes de amebas sin precisar especie	71	120
C. Quistes no <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	16	20
D. No se observan quistes de amebas	139	179
<b>TOTAL</b>	<b>302</b>	<b>414</b>

Se analizaron las variables demográficas, epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos en cada grupo.

## 2.2. Procesamiento de las muestras

### 2.2.1. Heces

Las heces llegaron al laboratorio refrigeradas (4°C) o congeladas a -20°C. En las que llegaron refrigeradas, se separó una parte para realizar el método de concentración y el resto se conservó a -20°C hasta proceder a la extracción de ADN y análisis por PCR. Si las heces venían congeladas, se guardaban a -20°C hasta llevar a cabo la extracción de ADN y análisis por PCR.

### 2.2.2. Muestra del absceso hepático

El material obtenido por punción-aspiración del absceso hepático se conservó a 4°C, hasta proceder a la extracción de ADN y análisis por PCR. En nuestro laboratorio no se realizó el examen microscópico porque habían pasado varios días desde la toma de la muestra.

### **2.2.3. Suero**

Las muestras de suero se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento y posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

## **2.3. Técnicas empleadas para el diagnóstico de *E. histolytica* y *E. dispar* en el laboratorio**

### **2.3.1. Examen microscópico**

Las heces se observaban al microscopio tras realizar un protocolo de concentración difásica, formalina-éter, y tinción con lugol. Aquellas muestras que presentaban quistes difíciles de diferenciar fueron posteriormente procesadas mediante la tinción permanente Negro de Clorazol.

#### **Técnica difásica de formalina-éter**

A continuación se describe el protocolo. Se utilizó un sistema comercial cuyos tubos llevan incorporado un filtro adecuado para la realización de la técnica de concentración, BIOSEPAR (ROTEC MEDICA) :

1. Colocar una pequeña cantidad de heces en el tubo BIOSEPAR que contiene 3 ml de formalina, dejar las heces 20 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
2. Cerrar el tubo con la muestra y agitar en el vortex para disolver las heces.
3. Destapar el tubo y añadir 1,25 ml de éter.
4. Enroscar el tubo cónico que contiene el filtro e invertir.
5. Mezclar agitando de 10 a 30 segundos de arriba a abajo
6. Dejar filtrar la suspensión colocando el tubo en una gradilla durante unos minutos, hasta que termine de filtrar.
7. Se quita el filtro con el tubo y ponemos el tapón en el tubo cónico.
8. Centrifugar el filtrado 5 minutos a 2500 rpm.
9. Desenroscar el tapón y quitar el sobrenadante.
10. Mirar el sedimento al microscopio con lugol y solución salina.

### Técnica de tinción de Negro de Clorazol

En el protocolo que se describe el colorante empleado se fija al núcleo y a otras estructuras citoplasmáticas de las amebas que se presentarán de color oscuro. Las láminas teñidas se observan con objetivo de inmersión (100X) para poder detallar la morfología y las características de los núcleos y así poder diferenciar las amebas del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* de otras amebas. A continuación se describe el protocolo de la técnica de tinción.

1. Hacer extensión de heces y rápidamente incluir en el colorante.
2. Teñir con el colorante Negro de Clorazol de 1 a 24 horas.
3. Lavar con agua corriente.
4. Alcohol etílico (Etanol al 96%)..... 10 minutos.
5. Etanol 100%..... 5 minutos.
6. Xilol ..... 5 minutos.
7. Añadir líquido de montaje.

#### 2.3.2. Detección de anticuerpos frente a *E. histolytica* en suero

La detección de anticuerpos IgG anti-*E. histolytica* se realizó con un ELISA comercial (RIDASCREEN<sup>R</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.3.3. PCR

##### Extracción de ADN a partir de muestras biológicas

La extracción de ADN de las muestras de heces y de absceso hepático se llevó a cabo por el método comercial descrito anteriormente en el apartado 1.4.

## PCR

Para el diagnóstico por PCR se utilizaron 3 µl del ADN extraído de las diferentes muestras, y se procedió según el protocolo establecido (ver Resultados 1).

### 3. Caracterización genotípica de las cepas de *E. histolytica* de los pacientes con amebiasis

Para el estudio de la variabilidad de las cepas de *E. histolytica* de los pacientes con amebiasis incluidos en el estudio, se seleccionaron dos regiones del ADN del parásito que presentan polimorfismo en su secuencia:

- I) Una secuencia no codificante STRs (repeticiones cortas en tandem), eligiéndose el locus 1-2 (actualmente denominado DA).
- II) Una secuencia que codifica la proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP).

Para determinar el genotipo de las cepas de *E. histolytica*, se utilizó el ADN extraído directamente de las muestras clínicas, heces o pus del absceso, de los pacientes con amebiasis.

#### 3.1. Genotipado de *E. histolytica* por análisis del locus 1-2

##### 3.1.1. Amplificación

Para conocer el polimorfismo del locus 1-2 de *E. histolytica*, se puso a punto una PCR utilizando los *primers* descritos por Zaki & Clark (2001). Para conseguir la amplificación del ADN de todas las muestras, se realizó una segunda amplificación con los *primers* descritos por (Zaki *et al.* 2002). En el programa del termociclador, las temperaturas de anillamiento utilizadas fueron las descritas por (Ali *et al.* 2005).

Se realizó el análisis del locus1-2 en 29 muestras de ADN, procedentes de los 28 pacientes con amebiasis, ya que en el paciente nº 5 se aisló *E. histolytica* en las heces y en el pus del absceso hepático.

### **Primera amplificación**

Volumen de reacción 50 µl: 5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 15 pmol primer R1, 15 pmol primer R2 (tabla 6), 1,5 U *Tth* y 1 µl de ADN extraído de las muestras clínicas del pus del absceso y 3 µl del ADN extraído de las heces. Todos los reactivos utilizados eran de BIOTOOLS (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., España).

El programa del termociclador para esta reacción fue el siguiente: 94° C 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C 30 segundos, anillamiento a 56°C 30 segundos y extensión a 72°C 30 segundos) y extensión final a 72°C 5 minutos.

### **Segunda amplificación**

Volumen de reacción 50 µl: 5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 15 pmol *primer Hsp1*, 15 pmol *primer Hsp2* (Tabla 6), 1.5 U *Tth* y 1 µl de ADN de la primera PCR para las muestras de absceso y 2 µl para las muestras de heces. Todos los reactivos utilizados son de BIOTOOLS (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., España).

El programa del termociclador para esta reacción fue el siguiente: 94°C 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C 30 segundos, anillamiento a 50°C 30 segundos y extensión a 72°C 30 segundos) y extensión final a 72°C 5 minutos.

**Tabla 6.** Secuencias de los *primers* utilizados en la PCR de caracterización

Denominación	Secuencia	Referencia
R1	CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT	(Zaki & Clark 2001)
R2	CTTACACCCCCATTAACAAT	(Zaki & Clark 2001)
Hsp1	AGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT	(Zaki <i>et al.</i> 2002)
Hsp2	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	(Zaki <i>et al.</i> 2002)

El termociclador empleado fue el modelo Gen Amp 2700 PCR System (Applied Biosystems).

Los productos de PCR se visualizaron tras someterlos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en tampón TBE 1X, tinción con BrEt (1µl de solución 10mg/ml por cada ml de gel) y transiluminación con UV.

### 3.1.2. Secuenciación de los productos de amplificación del locus 1-2

#### 3.1.2.1. Purificación de los productos de la amplificación

Los productos amplificados se pasaron por columnas de purificación de ADN (*QIAquick® Spin Handbook*, QIAGEN). Este sistema de purificación, concentración y separación de sales, consiste en la utilización de una membrana de sílice diseñada para recuperar el ADN de diversas soluciones, eliminando los productos contaminantes como enzimas, oligonucleótidos y dNTPs. La membrana de sílice aumenta la unión específica de ADN en presencia de sales, y retiene el ADN durante la elución con las diferentes soluciones durante el proceso, permitiendo la concentración de la muestra. El protocolo seguido fue el descrito por el fabricante, que consistió en añadir cinco volúmenes de la solución PB, facilitada en el ensayo comercial, a un volumen del producto amplificado y ,tras mezclar, se añadió la muestra a la columna, centrifugándola un minuto a 13.000 rpm, tras la centrifugación se eliminó el eluido. Para lavar, se añadieron 0,75 ml de la solución PE a la columna, y se centrifugó

de nuevo a 13.000 rpm durante un minuto. Para asegurarnos que el etanol se eliminaba totalmente, se procedió a una nueva centrifugación. Se colocó la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y se añadió 30 µl de agua estéril en el centro de la membrana de la columna. Tras una incubación de un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó la columna a 13.000 rpm durante un minuto, consiguiéndose así la recuperación del eluido con una alta concentración de ADN.

### 3.1.2.2. Secuenciación

La secuenciación (Sanger *et al.* 1977) se desarrolló en un volumen de reacción de 10 µl, el cual estaba formado por 5 µl de ADN amplificado y purificado, 4 µl de la mezcla de secuenciación *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems) y 1 µl de *primer*. Se llevó a cabo una reacción con el *primer forward* y otra reacción con el *primer reverse*.

El proceso de secuenciación se realizó en la Unidad de Biopolímeros del CNM del ISCIII, mediante el sistema *AbiPrism 377* (Applied Biosystem), siguiendo el protocolo de reacción *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reacción Kit*. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa BioEdit (licencia pública). La comparación con otras ya descritas y secuencias obtenidas en nuestros experimentos se realizó mediante el *Genbank*.

## 3.2. Genotipado de *E. histolytica* por análisis del gen SREHP

### 3.2.1. Amplificación

Para conocer la variabilidad de gen SREHP, se llevo a cabo una PCR utilizando los *primers* descritos por Clark & Diamond (1993). Para conseguir la amplificación del ADN de todas las muestras, se realizó una segunda amplificación con los primers descritos por Ayeh-Kumi *et al.* (2001).

Se realizó el análisis del gen SREHP en 22 muestras de ADN, procedentes de los 21 pacientes con amebiasis, ya que en el paciente nº 5 se aisló *E.*

*histolytica* en las heces y en el pus del absceso hepático. Los resultados obtenidos con las primeras cepas analizadas con esta técnica demostraron que no era un método adecuado para los objetivos de nuestro trabajo, por lo que no se aplicó al resto de las cepas disponibles.

### **Primera amplificación**

Volumen de reacción 50 µl: 5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 15 pmol *primer* SREHP5, 15 pmol *primer* SREHP3 (tabla 7), 1,5 U Tth y 1 µl de ADN extraído de las muestras clínicas del pus del absceso y 3 µl del ADN extraído de las heces. Todos los reactivos utilizados eran de BIOTOOLS (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., España):

El programa del termociclador para esta reacción fue el siguiente: 94°C 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C 30 segundos, anillamiento a 50°C 30 segundos y extensión a 72°C 30 segundos) y extensión final a 72°C 5 minutos.

### **Segunda amplificación**

Volumen de reacción 50 µl: 5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 15 pmol *primer* nSREHP5, 15 pmol *primer* nSREHP3 (tabla 7), 1,5 U Tth y 1 µl de ADN de la primera PCR. Todos los reactivos utilizados son de BIOTOOLS (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., España).

El programa del termociclador para esta reacción fue el siguiente: 94° C 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94° C 30 segundos, anillamiento a 55° C 30 segundos y extensión a 72° C 30 segundos) y extensión final a 72° C 5 minutos.

**Tabla 7.** Secuencias de los *primers* utilizados en la PCR de caracterización.

Denominación	Secuencia	Referencia
SREHP5	GCT AGT CCT GAA AAG CTT GAA GAA GCT G	(Clark& Diamond 1993)
SREHP3	GGA CTT GAT GCA GCA TCA AGG T	(Clark& Diamond 1993)
nSREHP5	TAT TAT TAT CGT TAT CTG AAC TAC TTC CTG	(Ayeh-Kumi <i>et al.</i> 2001)
nSREHP3	TGA AGA TAA TGA AGA TGA TGA AGA TG	(Ayeh-Kumi <i>et al.</i> 2001)

El termociclador empleado fue el modelo Gen Amp 2700 PCR System (Applied Biosystems).

Los productos de PCR se visualizaron tras someterlos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en tampón TBE 1X, tinción con BrEt (1 $\mu$ l de solución 10mg/ml por cada ml de gel) y transiluminación con UV.

### 3.2.2. Secuenciación de los productos de amplificación del gen SREHP

Se realizó igual que la llevada a cabo con el locus 1-2 (ver 3.1.2.).

## 4. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos se incorporaron a una base de datos informatizada para su estudio descriptivo y comparativo (hoja de cálculo del programa informático SPSS 15.0, SPSS S. L., Madrid, España).

Se estudió la normalidad de las variables mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,01$ .

Las diferencias entre las variables cualitativas se calcularon mediante tablas de contingencia, determinándose la significación de las diferencias observadas mediante el test de  $X^2$  o el de Fisher.

Las diferencias entre variable cuantitativas se analizaron utilizando el análisis de la varianza (ANOVA de un factor), con comparaciones múltiples *post hoc* mediante el test de Bonferroni. Cuando las variables no se ajustaron a la normal, las comparaciones múltiples se realizaron con el test  $T_2$  de Tamhane. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,01$ .

## ***RESULTADOS***

## 1. Desarrollo y validación de una técnica de PCR con aplicación para el diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*

### 1.1. Optimización de las condiciones para una *nested*-PCR

#### 1.1.1 Selección de la concentración de MgCl<sub>2</sub>

El mejor resultado fue obtenido, tanto para la primera como para la segunda PCR, utilizando una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2,0 mM. Esta concentración permitió conseguir la mayor cantidad de producto amplificado, sin observarse un mejor rendimiento al incrementar la concentración de MgCl<sub>2</sub> hasta 3,0 mM.

#### 1.1.2 Selección de la concentración de primers

Para las dos PCRs los mejores resultados se obtuvieron con 12,5 pmol de cada primer.

#### 1.1.3 Selección del número de ciclos de amplificación

El número de ciclos idóneo fue 45, como describe Evangelopoulos *et al.* (2000).

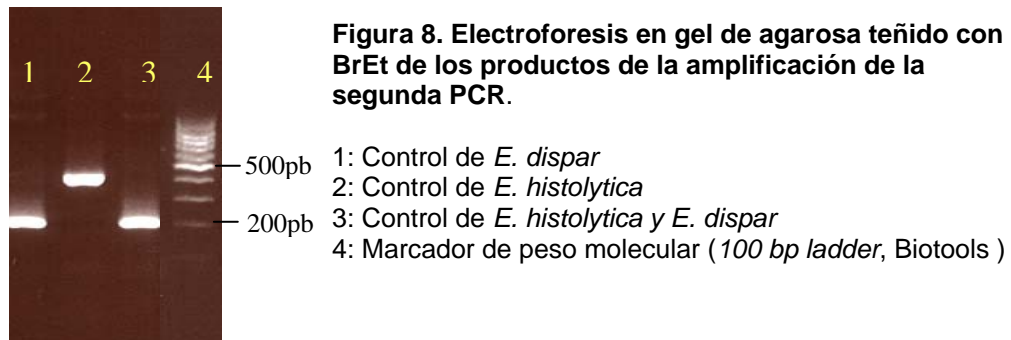
#### 1.1.4 Selección del volumen del producto de PCR de la primera reacción a utilizar en la segunda reacción

Se estableció que 5 µl de la primera PCR como el volumen que contenía la cantidad óptima para utilizar en la segunda PCR, ya que no se obtiene mejoría con la dilución 1/50.

#### 1.1.5 Selección de las condiciones de la segunda reacción de PCR

Los mejores resultados se obtuvieron haciendo por separado la segunda PCR para cada especie, una con los *primers* de *E. histolytica* y otra con los *primers* de *E. dispar*. Al realizar una *multiplex* PCR en el caso de

infecciones mixtas, introduciendo en el mismo tubo los dos controles de *E. histolytica* y *E. dispar*, siempre se amplificaba *E. dispar* en detrimento de *E. histolytica* (figura 8).



#### 1.1.6 Condiciones definitivas para la realización de la nested-PCR

Las condiciones óptimas para el desarrollo de la *nested-PCR* quedaron establecidas del siguiente modo.

##### **Primera PCR**

Volumen de reacción 50  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 2,0 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M dNTP, 12,5 pmol *primer* E1, 12,5 pmol *primer* E2, 1,25 U *Tth* y 3  $\mu$ l del ADN problema.

El programa del termociclador para esta reacción fue el siguiente: 94°C 5 minutos, seguido de 45 ciclos (desnaturalización a 94°C 30 segundos, anillamiento a 47°C 30 segundos y extensión a 72°C 30 segundos) y extensión final a 72°C durante 10 minutos.

## Segunda PCR

### *E. histolytica*

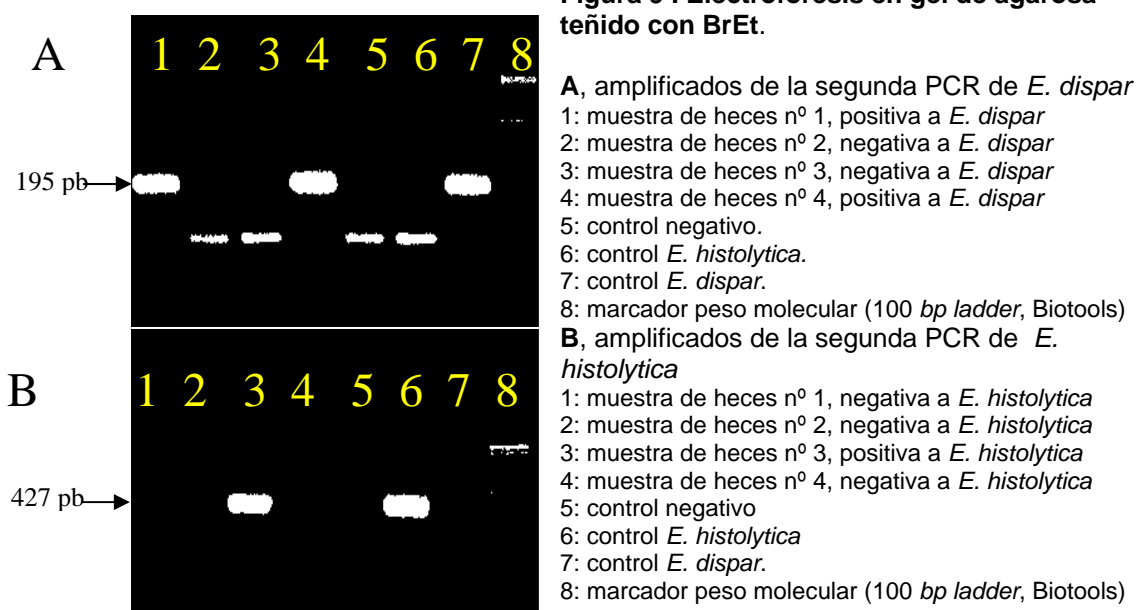
Volumen de reacción 50  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 12,5 pmol *primer* Eh-l, 12,5 pmol *primer* Eh-r, 1,25 U *Tth* y 5  $\mu$ l de la primera PCR.

### *E. dispar*

Volumen de reacción 50  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 12,5 pmol *primer* Ed-l, 12,5 pmol *primer* Ed-r, 1,25 U *Tth* y 5  $\mu$ l de la primera PCR .

El programa del termociclador para esta segunda reacción fue el siguiente: 94°C 5 minutos, seguido de 45 ciclos (desnaturalización a 94°C 30 segundos, anillamiento 60°C 30 segundos y extensión a 58°C 30 segundos) y extensión final a 72°C durante 10 minutos.

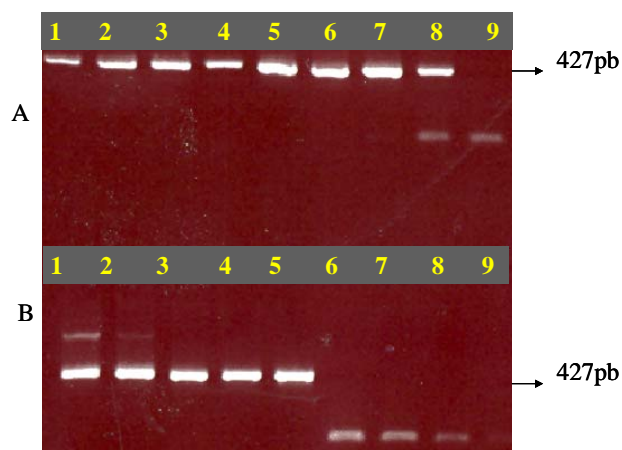
En la figura 9 se presentan los resultados de la *nested*-PCR de distintas muestras.



## 1.2. Determinación de la sensibilidad de la *nested*-PCR con ADN de *E. histolytica* y *E. dispar* procedente de cultivo axénico

Los resultados obtenidos con la *nested*-PCR al analizar cantidades decrecientes de ADN de *E. histolytica* y *E. dispar*, procedente de cultivo axénico, pusieron de manifiesto que la última dilución de ADN detectada fue la equivalente a 0,001 parásitos. Cuando se añadió el ADN del parásito en 5  $\mu$ l de ADN extraído de una muestra de heces negativa a *E. histolytica* y *E. dispar*, la cantidad detectada fue la equivalente a 1 parásito, figura 10.

**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los amplificados de la segunda PCR. Estudio de Sensibilidad**



### A: Diluciones seriadas del ADN de *E. histolytica*

- 1: dilución del ADN equivalente a 10.000 parásitos
- 2: dilución del ADN equivalente a 1.000 parásitos
- 3: dilución del ADN equivalente a 100 parásitos
- 4: dilución del ADN equivalente a 10 parásitos
- 5: dilución del ADN equivalente a 1 parásitos
- 6: dilución del ADN equivalente a 0,1 parásitos
- 7: dilución del ADN equivalente a 0,01 parásitos
- 8: dilución del ADN equivalente a 0,001 parásitos
- 9: dilución del ADN equivalente a 0,0001 parásitos

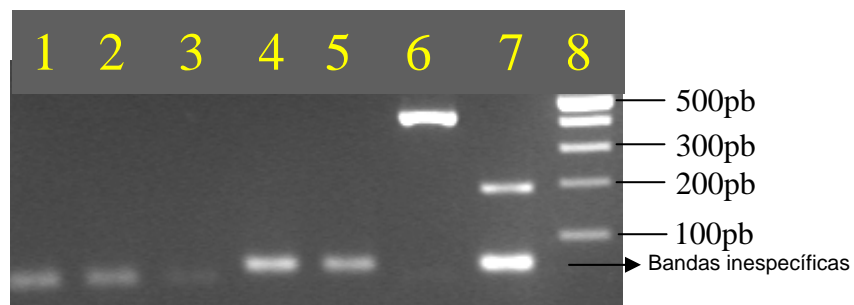
### B: Diluciones seriadas del ADN de *E. histolytica* junto con ADN extraído de una muestra de heces

- 1: dilución del ADN equivalente a 10.000 parásitos
- 2: dilución del ADN equivalente a 1.000 parásitos
- 3: dilución del ADN equivalente a 100 parásitos
- 4: dilución del ADN equivalente a 10 parásitos
- 5: dilución del ADN equivalente a 1 parásitos
- 6: dilución del ADN equivalente a 0,1 parásitos
- 7: dilución del ADN equivalente a 0,01 parásitos
- 8: dilución del ADN equivalente a 0,001 parásitos
- 9: dilución del ADN equivalente a 0,0001 parásitos

### 1.3. Estudio de especificidad con otros parásitos

No se obtuvo producto de amplificación al analizar mediante *nested-PCR* las muestras de heces con otros parásitos (*E. coli*, *E. hartmanni*, *E. nana*, *I. butschlii*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Ciclospora cayetanensis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*), figura 11.

**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt de los productos de la segunda PCR. Estudio de Especificidad**



- 1: muestra de heces con *Giardia duodenalis*
- 2: muestra de heces con *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium spp.*
- 3: muestra de heces con *E. coli* y *E. nana*
- 4: muestra de heces con *E. hartmanni*
- 5: control negativo
- 6: control de *E. histolytica*
- 7: control de *E. dispar*
- 8: marcador peso molecular (100 bp ladder, Biotools)

### 1.4. Elección del método de extracción de ADN a partir de muestras biológicas

Como se indicó en la sección de Material y Métodos, se realizó un estudio preliminar para establecer el método de extracción del ADN más adecuado. Para dicho estudio, se emplearon diez muestras de heces con quistes de *E. histolytica/E. dispar* y tres muestras del material procedente de abscesos hepáticos amebianos. En las trece muestras se realizaron, en paralelo, los dos métodos de extracción. El resultado de la PCR fue negativo para las diez muestras de heces cuando se utilizó el método de tiocianato de guanidina. Por el contrario, el resultado de la PCR fue positivo en las diez muestras, cuando se empleó la técnica de extracción

comercial. El amplificado del ADN obtenido fue de 197 pb, que se correspondía con el patrón de *E. dispar*. Con estos resultados, se optó por el *Kit* comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) como método de extracción de ADN para las muestras fecales.

En cuanto a las muestras de los abscesos hepáticos, las dos técnicas de extracción mostraron una rentabilidad similar, ya que se obtuvieron resultados positivos por ambos métodos en las tres muestras procesadas. El producto amplificado tenía un tamaño de 427 pb y fue identificado como ADN procedente de *E. histolytica*. No obstante, se prefirió emplear también la técnica comercial, *QIAamp<sup>R</sup> DNA Mini Kit* (QIAGEN), en la extracción en muestras procedentes de abscesos hepáticos, ya que la calidad del ADN extraído fue mayor que con el método casero.

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, que mide la densidad óptica a 260 nm y 280 nm, así como la relación 260/280. El valor de dicho cociente indica la calidad del ADN, considerando óptimo un valor comprendido entre 1,8 y 2.

### **1.5. Elección de las condiciones para el envío de las muestras de heces**

En el estudio preliminar realizado, se evaluaron diferentes condiciones de conservación para establecer las condiciones de la remisión de muestras de heces al laboratorio. De las 10 muestras de heces conservadas con formalina, con quistes compatibles con *E. histolytica/E. dispar*, sólo en una muestra se obtuvo un amplificado correspondiente a ADN de *E. dispar*. De las 39 muestras de heces conservadas en SAF, en 10 se pudo conseguir un resultado positivo para *E. dispar* por la técnica de PCR. Por último, en las diez muestras de heces frescas congeladas, se logró amplificar, en todas ellas, un fragmento de ADN de *E. dispar* por la técnica de PCR. Con estos resultados, se consideró que la muestra adecuada para alcanzar una elevada sensibilidad con la técnica de PCR eran las heces frescas congeladas.

## **2. Aplicación Clínica de la PCR**

### **2.1. Diagnóstico de *E. histolytica* en pacientes con amebiasis extraintestinal**

Las características de los 15 enfermos con AHA fueron las siguientes. Cuatro eran viajeros, dos mujeres y dos hombres. Una mujer y un hombre habían visitado recientemente Venezuela, la otra mujer, el Sudeste Asiático y el otro varón, Costa Rica. Las dos viajeras con AHA, una estaba embarazada y la otra era VIH+. Ocho pacientes procedían de zonas endémicas de amebiasis, seis de Sudamérica y dos de África. Los pacientes sudamericanos, cinco varones y una mujer, eran tres de Colombia y los otros tres de Ecuador. Los dos pacientes africanos eran varones, uno de Nigeria y el otro de Guinea Ecuatorial. Por último, tres pacientes eran europeos que no habían viajado ni procedían de zonas endémicas de amebiasis. Dos eran españoles, una mujer y un hombre. La mujer vivía en Galicia y el hombre en Madrid, en ambos casos no se pudo encontrar una explicación epidemiológica, considerándose como casos autóctonos de amebiasis. El tercer paciente era un camionero holandés que en su historia clínica constaba que había mantenido relaciones sexuales con prostitutas africanas.

El examen microscópico del concentrado de las heces fue negativo en los seis pacientes con AHA en los que se analizó dicha muestra, tabla 8.

**Tabla 8.** Resultados de la técnica de PCR y de la microscopía en la muestra de heces de pacientes con AHA

Pacientes	Epidemiología	PCR en Heces	Microscopía
P-12	Viajero	<i>E. histolytica</i>	Negativa
P-15	Viajero	<i>E. histolytica</i>	Negativa
P-5	Sudamericano	<i>E. histolytica</i>	Negativa
P-10	Viajero	Negativa	Negativa
P-6	Autóctono	Negativa	Negativa
P-1	Autóctono	Negativa	Negativa

El resultado de la PCR y de la serología de los pacientes con AHA se muestra en la tabla 9, junto con la edad y el sexo. Hay que resaltar que exceptuando dos casos, la edad de los pacientes con AHA estaba comprendida entre los 28 y 40 años.

En los 14 pacientes que se incluyeron para el control de especificidad, el resultado de la PCR de la muestra del absceso hepático de otra etiología fue negativo. En cuanto a la serología de amebiasis también fue negativa en doce de ellos y en dos inmigrantes fue valorada como indeterminado (datos no mostrados).

**Tabla 9.** Resultados de PCR y serología en los pacientes con AHA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	PCR		Serología
				Heces	Absceso	
P-12	Viajero	33	H	<i>E. histolytica</i>	NR	Positiva
P-15	Viajero	40	M	<i>E. histolytica</i>	NR	Positiva
P-4	Viajero	35	M	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-9	Viajero	31	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-5	Sudamericano	36	H	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-3	Sudamericano	35	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-7	Sudamericano	28	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-8	Sudamericano	39	M	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-24	Sudamericano	35	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-2	Sudamericano	35	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-22	Africano	37	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-10	Africano	28	H	Negativa	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-27	Autóctono	36	H	NR	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-6	Autóctono	62	M	Negativa	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-1	Autóctono	57	H	Negativa	<i>E. histolytica</i>	Positiva

NR: No realizado, H: hombre, M: mujer

## 2.2. Diagnóstico y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces

El segundo objetivo del presente trabajo fue analizar la utilidad de la técnica de PCR en muestras de heces, para el diagnóstico de la amebiasis intestinal.

En la tabla 10 se recoge un resumen de los resultados obtenidos con la técnica molecular de PCR diseñada para la detección de *E. histolytica* y su diferenciación de *E. dispar*. La tabla incluye los datos obtenidos con los 302 pacientes, cuyas heces fueron analizadas para realizar el estudio, clasificados según el resultado de su examen microscópico directo.

**Tabla 10.** Resultado de la PCR y resultado del examen microscópico en las muestras de heces

Resultado examen microscópico	Pacientes	Resultado PCR	
		<i>E. histolytica</i> n (%)	<i>E. dispar</i> n (%)
A. Quistes compatibles con <i>E. histolytica/E. dispar</i>	76	11 (14,4)	63 (82,9)
B. Quistes de amebas sin precisar especie	71	0	40 (56,3)
C. Quistes no <i>E. histolytica/E. dispar</i>	16	0	0
D. No se observan quistes de amebas	139	2 (1,4)	10 (7,2)
TOTAL	302	13 (4,3)	113 (37,4)

En el estudio se incluyeron 146 pacientes inmigrantes (48%). De de éstos, 130 (89%) eran inmigrantes de origen africano y sudamericano. Hay que destacar que la mayor parte de los pacientes africanos eran de Guinea Ecuatorial. Además, se estudiaron 136 (45%) viajeros a zonas endémicas de amebiasis. Finalmente, se analizaron las muestras de heces de 20 pacientes españoles (6%) en los que no constaba que hubieran realizado viajes a países en desarrollo. En la tabla 11 se muestra el país de procedencia de los pacientes incluidos en el estudio junto con los resultados obtenidos por el examen microscópico.

**Tabla 11.** País de procedencia y resultados de la microscopía de las heces

PROCEDENCIA	Resultado de la Microscopía				Total
	Negativo	Quistes de amebas	Quistes de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	Quistes no <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	
España	9	5	5	1	20
No consta	1	11	1	1	14
Otros países	0	0	1	1	2
África	13	26	35	7	81
Sudamérica	8	25	11	5	49
Viajero	108	4	23	1	136
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>71</b>	<b>76</b>	<b>16</b>	<b>302</b>

En la tabla 12 se incluyan los resultados obtenidos con la técnica de PCR desarrollada en este trabajo y el país de procedencia de los pacientes analizados. Hay que resaltar que en ningún paciente sudamericano se amplificó ADN de *E. histolytica*.

**Tabla 12.** País de procedencia y resultado de la PCR

PROCEDENCIA	RESULTADO DE PCR			Total
	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i>	Negativa	
España	10	1	9	20
Otros países	1	0	1	2
África	43	9	29	81
Sudamérica	25	0	24	49
Viajero	24	3	109	136
No consta	10	0	4	14
<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>13</b>	<b>176</b>	<b>302</b>

En la tabla 13 se muestran los resultados combinados de la microscopía y de la técnica de PCR en los pacientes inmigrantes, clasificados por su origen geográfico.

**Tabla 13.** Resultado de PCR y microscopía de los inmigrantes africanos y sudamericanos

PROCEDENCIA	MICROSCOPIA	RESULTADO DE PCR			
		<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i>	Negativa	Total
<b>África</b>					
	Negativo	3	0	10	13
	Quistes de amebas	14	0	12	26
	Quistes <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	26	9	0	35
	Quistes no <i>E.histolytica/E.dispar</i>	0	0	7	7
	<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>9</b>	<b>29</b>	<b>81</b>
<b>Sudamérica</b>					
	Negativo	2	0	6	8
	Quistes de amebas	13	0	12	25
	Quistes <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	10	0	1	11
	Quistes no <i>E.histolytica/E.dispar</i>	0	0	5	5
	<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>49</b>
<b>Total</b>		<b>68</b>	<b>9</b>	<b>53</b>	<b>130</b>

El análisis estadístico de los datos mostró que no existían diferencias significativas entre africanos y sudamericanos, al comparar los resultados del examen microscópico. Así, el análisis con tablas de contingencia (test de  $X^2$  con  $P < 0,01$ ) no halló diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Con el protocolo de PCR tampoco se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, en el caso de los enfermos con *E. histolytica*, la  $P$  fue de 0,013, cercana al nivel de significación elegido, por lo que estos datos podrían cambiar, si se aumentara el número de muestras analizadas.

Hay que indicar que 16 de los individuos incluidos en el estudio eran pacientes a los que se les había solicitado el estudio por PCR para realizar un control postratamiento. En todos los casos el resultado de la técnica de PCR fue negativo. Los datos de estos de enfermos se excluyeron cuando se analizaron los datos por sus características clínicas.

En lo que se refiere al análisis de los resultados teniendo en cuenta los datos clínicos disponibles, reveló interesantes datos. La clínica que presentaban los pacientes, tanto emigrantes como españoles, se muestra en la tabla 14, donde también se incluye el resultado obtenido por la técnica de PCR.

**Tabla 14.** Resultado de la PCR y la clínica presentada por los pacientes incluidos en el estudio

CLINICA	RESULTADO DE PCR			Total
	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i>	Negativa	
<b>Asintomático</b>	44	3	20	<b>67</b>
<b>Diarrea</b>	24	6	99	<b>129</b>
<b>No consta</b>	36	3	18	<b>57</b>
<b>Otros síntomas</b>	9	1	23	<b>33</b>
<b>Total</b>	<b>113</b>	<b>13</b>	<b>160</b>	<b>286</b>

La tabla muestra como dato más interesante, que 24 pacientes con diarrea tenían *E. dispar*, lo que implica que hubieran sido diagnosticados de amebiasis intestinal si sólo se hubiera realizado el examen microscópico. Por otra parte, tres casos con *E. histolytica* (23%), detectados mediante la técnica de PCR, no mostraban síntomas de amebiasis.

En la tabla 15 se vuelven a mostrar los datos clínicos que presentaban los pacientes analizados en este trabajo, clasificados por el área geográfica de

procedencia y el resultado obtenido con la técnica de PCR. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

**Tabla 15.** Resultado de la PCR según el país de procedencia y la clínica presentada por los pacientes incluidos en el estudio

PROCEDENCIA	CLINICA	RESULTADO PCR			Total
		<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i>	Negativa	
<b>España</b>	Asintomático	2	0	2	4
	Diarrea	6	1	1	7
	No constan	1	0	0	1
	Otros síntomas	1	0	4	5
Total		<b>10</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>18</b>
<b>No consta</b>	Asintomático	0	0	3	3
	Diarrea	1	0	0	1
	No constan	8	0	1	9
	Otros síntomas	1	0	0	1
Total		<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>14</b>
<b>Otros países</b>	Diarrea	0	0	1	1
	No constan	1	0	0	1
Total		<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>África</b>	Asintomático	19	3	12	34
	Diarrea	4	3	3	10
	No constan	17	3	5	25
	Otros síntomas	3	0	4	7
Total		<b>43</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	<b>76</b>
<b>Sudamérica</b>	Asintomático	7	0	2	9
	Diarrea	5	0	3	8
	No constan	9	0	11	20
	Otros síntomas	4	0	5	9
Total		<b>25</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>46</b>
<b>Viajeros</b>	Asintomático	16	0	1	17
	Diarrea	8	2	91	101
	No constan	0	0	1	1
	Otros síntomas	0	1	10	11
Total		<b>24</b>	<b>3</b>	<b>103</b>	<b>130</b>
<b>Total general</b>		<b>113</b>	<b>13</b>	<b>160</b>	<b>286</b>

A continuación se enumeran y se comentan, los resultados obtenidos con las muestras de heces, agrupados según el examen microscópico.

**A) Heces con quistes de amebas compatibles con *E. histolytica* y *E. dispar***

De los 76 pacientes estudiados, 38 eran hombres y 38 mujeres. En 63 pacientes, el resultado de la PCR fue positivo para *E. dispar*. Cinco eran españoles sin antecedentes de viajes, tres tenían diarrea, uno presentaba dolor abdominal y uno era asintomático. Veinte habían viajado recientemente a zonas endémicas de amebiasis, cuatro presentaban diarrea, siendo diagnosticados dos de giardiosis y los otros 16 estaban asintomáticos. Treinta y seis procedían de zonas endémicas de amebiasis, 10 de Sudamérica y 26 de África. Cinco pacientes sudamericanos estaban asintomáticos, tres presentaban diarrea y dos tenían dolor abdominal. De los 26 pacientes africanos, 20 eran de Guinea Ecuatorial. Diecisiete estaban asintomáticos, cuatro tenían diarrea, uno dolor abdominal y en cuatro no constaba. Por último, una paciente era rumana y en otro paciente no se conocía su procedencia.

En 11 pacientes se diagnosticó *E. histolytica* por la técnica de PCR. En un paciente guineano se pudo detectar una infección mixta, ya que se amplificó ADN de *E. histolytica* y de *E. dispar* en la misma muestra. Las características de los pacientes diagnosticados de amebiasis intestinal fueron las siguientes. Nueve pacientes procedían de África, siendo 8 de Guinea Ecuatorial. De ellos, en tres pacientes no se pudo conocer los datos clínicos, tres tenían diarrea y los otros tres, fueron diagnosticados como portadores asintomáticos. En un varón procedente del África subsahariana se observaron trofozoítos de *E. histolytica* en el examen en fresco de las heces. Por último, los dos casos restantes fueron observados en una pareja de turistas españoles, que había realizado un viaje a Méjico hacía nueve meses. Él tenía diarrea con heces sanguinolentas y ella presentaba molestias intestinales. En la tabla 16 se muestra los datos más destacados de estos once enfermos.

En seis pacientes con amebiasis intestinal se efectuó la detección de anticuerpos frente a *E. histolytica*, obteniéndose un resultado positivo en cinco de ellos. Tres pacientes tenían diarrea y dos eran portadores asintomáticos. En la mujer que había realizado el viaje a Méjico y presentaba molestias intestinales, el resultado de la serología fue negativo.

En dos pacientes, una mujer sudamericana asintomática y un viajero con diarrea, el resultado de la PCR fue negativo.

### **B) Heces con quistes de amebas sin precisar especie**

De los 71 pacientes estudiados, 35 eran hombres y 25 mujeres. En 11 casos no se recogió información demográfica. De los pacientes con información disponible, cinco pacientes eran españoles sin antecedentes de viajes, otros cuatro también eran españoles, pero habían viajado recientemente a zonas endémicas de amebiasis. Finalmente, 51 procedían de zonas endémicas, 25 de Sudamérica y 26 de África. La información demográfica, epidemiológica y clínica no estaba detallada en este grupo de enfermos. La razón de ello es que muchas de las muestras procedían de inmigrantes, a los que se les realiza un control rutinario de heces, para buscar parásitos, independientemente de la sintomatología que presenten.

En 40 pacientes, un total de 60 muestras, se amplificó *E. dispar*. En ocho era desconocida su procedencia. Trece eran sudamericanos, de los que dos estaban asintomáticos, dos presentaban dolor abdominal y en nueve no constaba la clínica. Catorce eran africanos, dos estaban asintomáticos, uno presentaban dolor abdominal y en 11 no constaba la clínica. Dos pacientes habían realizado un viaje a zonas tropicales y tenían diarrea. Por último, tres eran españoles.

En los 31 pacientes restantes, el resultado de la PCR fue negativo para las dos especies de amebas.

**C) Heces con quistes de amebas no *E. histolytica* y *E. dispar***

Se procesaron las muestras de 16 pacientes, 5 hombres y 11 mujeres, en las que por microscopía se había observado quistes de amebas de otras especies no *E. histolytica*/*E. dispar*. Siete pacientes procedían de África, cuatro estaban asintomáticos, dos tenían diarrea y uno presentaba dolor abdominal. Cinco eran de Sudamérica, uno estaba asintomático, otro tenía diarrea, otro dolor abdominal y en dos no constaba la clínica. Dos pacientes eran españoles, de los cuales uno había viajado recientemente a zonas tropicales y tenía diarrea, el otro no tenía antecedentes de interés. Una paciente era de Rusia y presentaba diarrea. En un caso no se pudo recopilar la información epidemiológica. El resultado de la PCR fue negativo en todas las muestras analizadas.

**D) Heces en las que no se observan quistes de amebas**

Se analizaron 139 pacientes que en el examen microscópico de las heces no se observaron quistes de amebas. 72 eran hombres y 67 mujeres.

En 10 pacientes se obtuvo un resultado positivo a *E. dispar*. Dos eran españoles, tres africanos, dos sudamericanos y tres viajeros. Todos presentaban diarrea o algún síntoma intestinal.

En dos pacientes se consiguió amplificar un fragmento de *E. histolytica*. Una mujer había viajado a la India hacia cuatro meses. El otro, era un hombre que no había salido de Europa, pero refirió haber mantenido relaciones sexuales con prostitutas sudamericanas. Los dos tenían diarrea. En los dos pacientes se hizo la serología de amebas y el resultado fue también positivo, tabla 16.

En 127 el resultado de la PCR fue negativo. Dieciséis procedían de zonas endémicas, 6 de Sudamérica y 10 de África. En ocho se realizó la PCR como control postratamiento, cuatro tenían diarrea y cuatro presentaban clínica intestinal. Ciento cinco pacientes habían realizado un viaje a zonas endémicas de amebiasis, 88 tenían diarrea, 11 síntomas intestinales y en seis se realizó la PCR como control postratamiento. Por último, seis eran

españoles, cuatro habían estado en contacto con personas con sospecha de amebiasis y en dos se realizó la PCR como control postratamiento. En la tabla 16 se muestran los datos demográficos junto con los resultados de la PCR y la serología de los 13 pacientes con amebiasis intestinal.

**Tabla 16.** Resultados de la PCR y la serología de los pacientes con amebiasis intestinal

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	PCR	Serología
P-26	Viajero	40	H	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-25	Viajero	36	M	Molestias intestinales	<i>E. histolytica</i>	Negativa
P-11	Viajero	33	M	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-13	Autóctono	56	H	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-14	Africano	40	H	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	NR
P-16	Africano	15	H	ND	<i>E. histolytica</i>	NR
P-17	Africano	26	M	Asintomático	<i>E. histolytica</i>	NR
P-18	Africano	ND	ND	ND	<i>E. histolytica</i>	NR
P-19	Africano	23	M	ND	<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i>	NR
P-20	Africano	68	M	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-21	Africano	17	M	Diarrea	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-23	Africano	28	H	Asintomático	<i>E. histolytica</i>	Positiva
P-28	Africano	14	H	Asintomático	<i>E. histolytica</i>	Positiva

NR: No realizado, ND: No disponible, H: hombre, M: mujer

### 3. Caracterización de las cepas de *E. histolytica* obtenidas de los pacientes con amebiasis

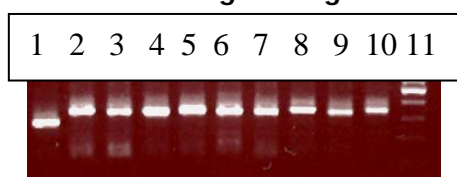
#### 3.1. Genotipado de *E. histolytica* por análisis del locus 1-2

##### 3.1.1. Amplificación

En las 29 muestras clínicas analizadas se obtuvo un amplificado por el protocolo de *nested*-PCR. Sin embargo, realizando solo la primera PCR en tres muestras de absceso hepático, y en diez muestras de heces no se apreció amplificación. Las muestras de absceso hepático en las que no se consiguió una amplificación en la primera PCR provenían de dos pacientes que habían recibido tratamiento con metronidazol. El primero de los casos durante cuatro días y el segundo por un periodo de diez días. En la tercera muestra de AHA, la extracción de ADN se realizó a partir del material de absceso, que previamente se había tratado con antibióticos y otros productos, para el cultivo de micobacterias, lo que puede tener alguna influencia en el resultado de la PCR, ya que el ADN del parásito podría haberse degradado.

En la figura 12 se muestran los productos de la *nested*-PCR del locus 1-2 de algunas de las cepas de *E. histolytica* incluidas en este estudio.

**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt**



**Productos de la *nested*-PCR del locus 1-2**

- 1:pus del AHA del P1
  - 2:pus del AHA del P2
  - 3:pus del AHA del P3
  - 4:pus del AHA del P4
  - 5:pus del AHA del P5
  - 6:pus del AHA del P6
  - 7:pus del AHA del P7
  - 8:pus del AHA del P8
  - 9:pus del AHA del P9
  - 10:pus del AHA del P10
  - 11:Marcador de peso molecular 100pb
- \*P= paciente

### 3.1.2 Secuenciación de los productos de amplificación del locus 1-2

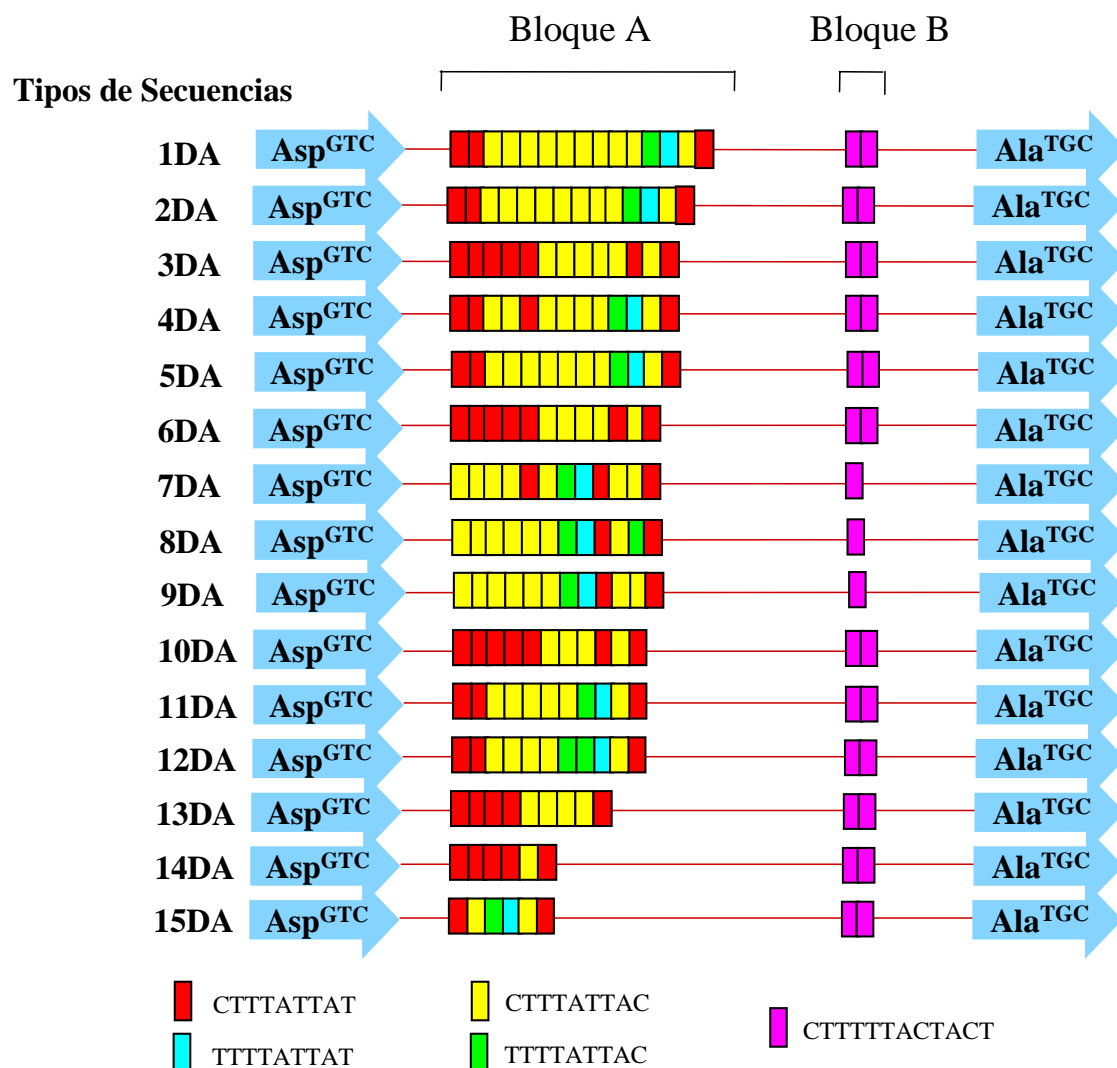
El proceso de secuenciación fue realizado con éxito en los 29 aislados caracterizados a partir del locus 1-2. En la figura 12 se muestra el alineamiento de las secuencias, indicando en la parte izquierda el paciente examinado.

**Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas del producto de amplificación del locus 1-2 (DA) de los 29 aislados de *E. histolytica***



Al analizar los datos se observan ocho tipos distintos de secuencias en las 28 cepas incluidas en el estudio. Según la información facilitada por el Dr. Graham Clark (datos no publicados) hay descritos en la actualidad 15 tipos de secuencias para el locus 1-2 (DA), figura 13.

**Figura 13.** Diferentes variantes de secuencias del locus 1-2 (DA)



Los tipos de secuencias se han obtenido analizando cepas conservadas en la Escuela de Medicina Tropical y de Salud Internacional de Londres y por los trabajos realizados por un grupo japonés (Haghighi *et al.* 2003), con cepas de su país y de Tailandia. Debe indicarse que estos estudios no incluyeron cepas representativas de todas las zonas geográficas, por lo que es probable que el número de tipos vaya aumentando cuando se analice un mayor número de cepas.

Según lo expuesto en el párrafo anterior, los resultados observados en nuestro estudio indican que la mayoría de las cepas analizadas se encuadraban dentro de los 15 tipos que se aceptan actualmente. Pero hay que destacar que se han detectado dos nuevos tipos de secuencias en las cepas de *E. histolytica* incluidas en nuestro estudio.

Así, se encontraron cinco cepas de *E. histolytica* del genotipo 5DA, tabla 17. El tipo 5DA ha sido previamente descrito en muestras clínicas de Japón y Tailandia. Los pacientes de nuestro estudio con este genotipo eran cuatro varones con AHA y una mujer con diarrea. Es importante resaltar que todos los pacientes ecuatorianos con amebiasis incluidos en el estudio presentaban este genotipo.

**Tabla 17.** Pacientes con *E. histolytica* genotipo 5DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	Genotipo
P-5*	Ecuatoriano	36	H	AHA	5DA
P-5	Ecuatoriano	36	H	AHA	5DA
P-2	Ecuatoriano	35	H	AHA	5DA
P-8	Ecuatoriano	36	H	AHA	5DA
P-21	Guinea Ecuatorial	17	M	Diarrea	5DA
P-22	Guinea Ecuatorial	37	H	AHA	5DA

P-5\*: muestra de heces

El genotipo 6DA fue el detectado con más frecuencia en nuestro estudio, ya que nueve cepas de *E. histolytica* fueron clasificadas en este tipo, tabla 18. El tipo 6DA ha sido previamente encontrado en muestras de Bangladesh, México, Tailandia y Japón. En este grupo se incluyeron los tres inmigrantes colombianos, cuatro viajeros, dos habían estado en la India y los otros dos en Venezuela, un paciente africano y finalmente un paciente madrileño que no había realizado viajes a zonas endémicas de amebiasis. Hay que destacar que las dos viajeras que padecían AHA

presentaban una situación de inmunosupresión, en concreto una estaba embarazada y la otra era VIH+.

**Tabla 18.** Pacientes con *E. histolytica* genotipo 6DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	Genotipo
P-3	Colombiano	35	H	AHA	6DA
P-7	Colombiano	28	H	AHA	6DA
P-24	Colombiano	30	M	AHA	6DA
P-14	Africano	40	H	Diarrea	6DA
P-4	Viaje a la India	35	M	AHA	6DA
P-11	Viaje a la India	33	M	Diarrea	6DA
P-15	Viaje a Venezuela	40	M	AHA	6DA
P-12	Viaje a Venezuela	33	H	AHA	6DA
P-27	Autóctono	36	H	AHA	6DA

Dos cepas de *E. histolytica* de nuestro estudio tenían secuencias similares al genotipo 8DA, tabla 19. Este genotipo ha sido hallado con anterioridad en muestras de Japón y Tailandia. Los dos pacientes con este genotipo eran españoles que no habían salido de nuestro país, por lo que puede especularse con la posibilidad de que este tipo esté presente en nuestro país.

**Tabla 19.** Pacientes con *E. histolytica* genotipo 8DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	<b>Genotipo</b>
P-6	Autóctono	62	M	AHA	8DA
P-13	Autóctono	54	H	Colitis	8DA

En un enfermo procedente de Guinea Ecuatorial, del que no se dispone de datos clínicos, tenía una cepa perteneciente al genotipo 10DA, tipo que ha sido descrito anteriormente en muestras de Venezuela, tabla 20.

**Tabla 20.** Paciente con *E. histolytica* genotipo 10DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	<b>Genotipo</b>
P-16	Guinea Ecuatorial	15	H	No consta	10DA

Otro enfermo guineano con diarrea tenía una cepa del tipo 11DA que ha sido previamente encontrado en muestras procedentes de Tailandia, tabla 21.

**Tabla 21.** Paciente con *E. histolytica* genotipo 11DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	<b>Genotipo</b>
P-20	Guinea Ecuatorial	68	M	Diarrea	11DA

En seis enfermos, cinco guineanos y un paciente holandés con antecedentes de relaciones sexuales con prostitutas africanas, se halló el tipo 15DA. Un dato a considerar es que en tres de estos casos, el paciente estaba asintomático, lo que puede interpretarse como una prueba de diferencias en la virulencia entre los diferentes tipos descritos. Este tipo ha sido previamente encontrado en muestras procedentes de Japón, tabla 22.

**Tabla 22.** Pacientes con *E. histolytica* genotipo 15DA

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	Genotipo
P-1	Holandés sin viajes	57	H	AHA	15DA
P-17	Guinea Ecuatorial	36	M	Asintomático	15DA
P-18	Guinea Ecuatorial	-	-	No consta	15DA
P-19	Guinea Ecuatorial	23	M	No consta	15DA
P-23	Guinea Ecuatorial	17	H	Asintomático	15DA
P-28	Guinea Ecuatorial	14	H	Asintomático	15DA

Por último y como resultado más interesante de nuestro estudio, cuatro cepas no pudieron encuadrarse en ninguno de los quince tipos descritos anteriormente, tabla 23. Estas cuatro cepas se clasificaron en dos nuevos tipos de secuencias. Tres de ellas se obtuvieron de viajeros españoles que habían visitado Méjico y Centroamérica, lo que indicaría que este tipo puede estar distribuido por esta zona geográfica.

**Tabla 23.** Pacientes con *E. histolytica* genotipo no descrito con anterioridad

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	Genotipo
P-9	Viaje a Costa Rica	31	H	AHA	Nuevo
P-25	Viaje a Méjico	36	M	Molestias intestinales	Nuevo
P-26	Viaje a Méjico	40	H	Colitis	Nuevo

El otro tipo no descrito hasta la fecha se halló en una cepa procedente de un emigrante nigeriano con AHA, tabla 24. Debe señalarse, que no se han estudiado cepas procedentes de este país africano en los estudios publicados previamente, por lo que aunque no puedan extraerse

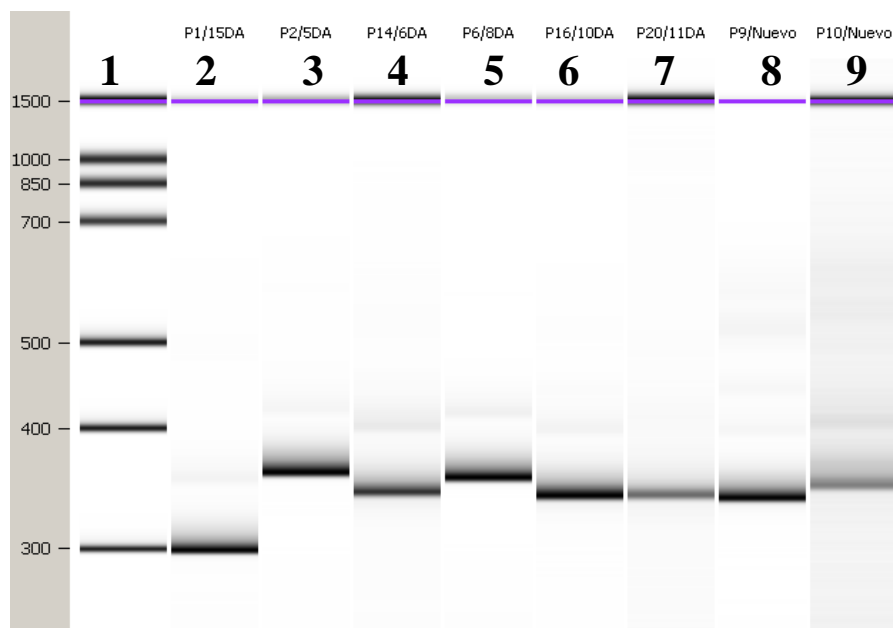
conclusiones definitivas, es probable que este tipo sea originario de este país subsahariano.

**Tabla 24.** Paciente con *E. histolytica* genotipo no descrito con anterioridad

Pacientes	Epidemiología	Edad en años	Sexo	Clínica	Genotipo
P-10	Nigeriano	28	M	AHA	Nuevo

En la figura se muestran los productos de la *nested-PCR* de los distintos genotipos para el locus 1-2 encontrados en este estudio.

**Figura 13.** Gel de electroforesis capilar



**Productos de la *nested-PCR* del locus 1-2**

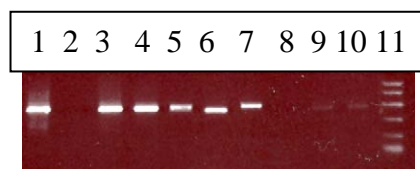
- 1: Marcador de peso molecular
  - 2: muestra del P11, genotipo 15DA
  - 3: muestra del P1, genotipo 5DA
  - 4: muestra del P14, genotipo 6DA
  - 5: muestra del P6, genotipo 8DA
  - 6: muestra del P16, genotipo 10DA
  - 7: muestra del P20, genotipo 11DA
  - 8: muestra del P9, genotipo nuevo
  - 9: muestra del P10, genotipo nuevo
- \*P= paciente

### 3.2 Genotipado de *E. histolytica* por análisis del gen SREHP

#### 3.2.1 Amplificación

Se obtuvo un amplificado en 18 de las 22 muestras analizadas, pertenecientes a 21 pacientes, tras la realización de la *nested*-PCR. En las muestras de ADN de tres pacientes no se consiguió obtener un amplificado por el protocolo de *nested*-PCR para el gen SREHP.

**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt**



#### Productos de la *nested*-PCR del SREHP

- 1:muestra de heces del P11
  - 2:muestra de heces del P12
  - 3:muestra de heces del P13
  - 4:muestra de heces del P5
  - 5:muestra de heces del P14
  - 6:muestra de heces del P15
  - 7:muestra de heces del P16
  - 8:muestra de heces del P17
  - 9:muestra de heces del P18
  - 10:muestra de heces del P19
  - 11:Marcador de peso molecular 100pb
- \*P= paciente

#### 3.2.2 Secuenciación de los productos de amplificación de SREHP

Se observó un alto grado de polimorfismo en las secuencias del gen SREHP analizadas, por lo que no pudieron establecerse genotipos, además de no observarse coincidencias con los resultados obtenidos por la tipificación con el locus 1-2. No obstante se obtuvieron algunas concordancias que deben comentarse. El paciente 15 y el 3 mostraron secuencias similares por este método. Estas dos cepas también fueron clasificadas en el mismo genotipo, el 6DA por la técnica de secuenciación del locus 1-2. Por otra parte, las cepas de los paciente 6 y 7 presentaron

secuencias similares por la amplificación del SREHP, aunque sus genotipos no coincidieron por el locus 1-2. De igual forma mostraron secuencias similares por la secuenciación del gen de la proteína rica en serina, las cepas de dos pacientes de origen guineano, el número 18 y 21. Estos dos pacientes tenían genotipos diferentes para el locus 1-2. Por último, los microorganismos aislados en los enfermos 4 y 5 mostraron secuencias similares por el segundo método de tipificación, siendo diferentes por la secuenciación del locus 1-2.

***DISCUSIÓN***

Los cambios que se han producido en el mundo en los últimos años han provocado alteraciones de la epidemiología de muchas infecciones. Enfermedades endémicas en los países en desarrollo, como la amebiasis, se están extendiendo a otras zonas geográficas, asociadas al fenómeno inmigratorio y a los viajes (Stanley, Jr. 2003).

En este contexto, es necesario desarrollar herramientas diagnósticas que permitan detectar con fiabilidad las infecciones importadas que, hasta hace unos años, eran poco comunes. Estas técnicas diagnósticas tienen que ser mejores que los métodos convencionales, cuya rentabilidad no es muy elevada. Entre estas nuevas herramientas diagnósticas destacan las técnicas moleculares, como las basadas en la PCR (Mirelman *et al.* 1997; Evangelopoulos *et al.* 2000).

#### **I. DESARROLLO DE UNA DE UNA TÉCNICA DE PCR CON APLICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN DE *E. histolytica* Y *E. dispar***

Nuestros resultados muestran que la técnica de *nested*-PCR desarrollada tiene una elevada sensibilidad para el diagnóstico de la amebiasis, ya que es capaz de detectar el ADN equivalente a un parásito. Además, el estudio de especificidad revela que la técnica no amplifica el ADN de otros parásitos y bacterias, que puedan estar presentes en las muestras de heces y en las del absceso hepático. Esta alta especificidad de la técnica evita la obtención de resultados falsos positivos.

Uno de los principales problemas que presentaba el diagnóstico molecular de la amebiasis era el relacionado con la extracción de ADN, ya que las heces es la muestra más compleja para realizar una PCR debido a la presencia de sustancias inhibitorias, como hemoglobina, bilirrubina, sales biliares, pectinas y carbohidratos, que se extraen junto con el ADN del parásito y disminuyen la sensibilidad de la técnica. Por tanto, la optimización del método de extracción de ADN a partir de las heces es crucial para el éxito en los estudios con protocolos de PCR.

Recientemente, han sido desarrollados métodos de aislamiento de ADN de muestras de heces, los cuales han incrementado la sensibilidad de los ensayos de PCR ya que eliminan los inhibidores, bien durante el proceso de extracción de ADN o purificando el ADN previamente extraído, con el empleo de compuestos quelantes y/o columnas de purificación. El *Kit* comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) es el método de extracción de ADN de muestras fecales más utilizado actualmente en los laboratorios de investigación clínica (Blessmann *et al.* 2002; Roy *et al.* 2005; Fotedar *et al.* 2007b; Gonin & Trudel 2003; Paglia & Visca 2004).

En cuanto a la evaluación de los métodos de extracción de ADN realizada en este trabajo, con el método de tiocianato de guanidina no se obtuvieron buenos resultados en las muestras de heces, ya que en ningún caso se logró obtener amplificadas por la técnica de PCR. Sin embargo, con el *Kit QIAamp<sup>R</sup> DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) en las diez muestras se consiguió amplificar el ADN de *E. dispar*. Se debe mencionar que en el protocolo de tiocianato de guanidina, no se efectuó un calentamiento a 90° C para ayudar a romper la pared del quiste de la ameba, lo que ha podido influir en que no se lograra un amplificado por la técnica de PCR en ninguna muestra de heces.

En las muestras de absceso hepático se consiguieron buenos resultados con los dos métodos de extracción, ya que en ambos casos se amplificó el fragmento de *E. histolytica* en las tres muestras analizadas. Sin embargo, se seleccionó el *kit* comercial *QIAamp<sup>R</sup> DNA Mini Kit* (QIAGEN) porque la calidad del ADN que se obtiene es mejor que con el método de tiocianato de guanidina y facilita posteriores análisis como los ensayos de caracterización de *E. histolytica* que se han llevado a cabo en este trabajo.

Además, creemos que estos resultados apoyan la utilización de las técnicas comerciales de extracción de ácidos nucleicos. Las técnicas diagnósticas moleculares se están convirtiendo en métodos rutinarios en algunos laboratorios de microbiología. El uso de métodos caseros no comerciales puede influir en la reproducibilidad de los resultados, por lo que si se disponen de *kits* comerciales, parece recomendable utilizarlos.

En ocasiones, el precio de las técnicas comerciales puede ser superior que la del método casero, pero puede justificarse el aumento de precio si los resultados mejoran en su reproducibilidad. No debe olvidarse, que las técnicas comerciales suelen simplificar el trabajo del laboratorio asistencial, ya que en muchas ocasiones pueden automatizarse. Además, deben incorporar control de lotes y otros requisitos de acreditación, lo que empieza a resultar imprescindible en los laboratorios de microbiología clínica.

Otro punto a tratar en este apartado es el de las condiciones del envío de las muestras. En la mayoría de los laboratorios hospitalarios de Parasitología las heces se recogen en contenedores con conservante, principalmente formalina al 10% o SAF. Sin embargo, el formol puede tener un efecto inhibitorio de la técnica de PCR, ya que afecta a la integridad del ADN impidiendo su posterior amplificación (Troll *et al.* 1997). Ramos y colaboradores (1999) describen como el efecto inhibitorio de la formalina está directamente relacionado con el tiempo que permanecen las heces en el conservante. En sus investigaciones demuestran que a partir del segundo día se produce una disminución de la sensibilidad de las técnicas de PCR. Por el contrario, otro grupo de investigadores, (Paglia & Visca 2004), no encuentran relación entre el tiempo de conservación de la muestra de heces en formalina y la inhibición de la técnica de PCR. En su trabajo obtienen los mismos resultados de amplificación de ADN de *E. dispar* por la técnica de PCR en las heces conservadas en formalina durante 1, 7, 30 y 90 días.

Nuestros resultados coinciden con los de los autores que muestran el efecto inhibitorio de la formalina, ya que se observó una disminución muy significativa de la sensibilidad de la técnica de PCR. Por otro lado, la acción de la formalina tamponada (SAF) también demostró tener un efecto inhibitorio, aunque de menor intensidad que el de la formalina al 10%. En este sentido, se obtuvo un resultado positivo con la técnica de PCR, en sólo un 10% de las heces con amebas conservadas en formalina, mientras que se consiguió amplificar ADN de *E. dispar* en un 25,6% de las muestras positivas conservadas en SAF. Esta diferencia puede explicarse

debido a que la concentración del formol es menor en la solución de SAF que en la de formalina al 10%.

Por lo tanto, y tras analizar los resultados del estudio preliminar, sólo las heces frescas congeladas mostraron una rentabilidad del 100%, para la amplificación eficiente del ADN de *E. histolytica* y *E. dispar* por la técnica de PCR. Lo que nos lleva a recomendar que los hospitales recojan muestras de heces frescas para realizar los estudios moleculares. En muchos laboratorios, la recogida de muestras de heces se realiza, rutinariamente, en contenedores que llevan incorporado algún conservante con formol, por lo que deberían revisarse los protocolos hospitalarios de recogida de muestras de heces, si se desea realizar estudios moleculares, como la amplificación de ácidos nucleicos por técnicas de PCR.

## II. APLICACIÓN CLÍNICA DE LA PCR

Como se ha indicado con anterioridad, el diagnóstico de las enfermedades parasitarias importadas se ha convertido en uno de los problemas emergentes en nuestro país. La identificación de estas infecciones necesita de personal capacitado y de técnicas microbiológicas fiables. En el caso de la amebiasis, hasta la aparición del fenómeno migratorio, el diagnóstico estaba basado en los exámenes microscópicos y en la serología. Sin embargo, en inmigrantes procedentes de zonas endémicas, estas técnicas tienen una rentabilidad limitada. El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido diseñar nuevos métodos diagnósticos, con intención de superar las limitaciones de los ensayos tradicionales. Una de estas técnicas es la que se discute en el presente trabajo.

La primera aplicación del método desarrollado en este trabajo fue el diagnóstico del absceso hepático amebiano. La técnica realizada a partir del material del absceso hepático mostró una sensibilidad del 100%, valor similar al descrito por Zaman y colaboradores (2000). En todas las muestras en las que se realizó la técnica, se amplificó ADN de *E.*

*histolytica*, incluso en tres casos que llevaban varios días de tratamiento con metronidazol, antes de obtener la muestra.

Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante los métodos tradicionales, se observaron algunos resultados interesantes. Los estudios serológicos también fueron positivos en todos los enfermos diagnosticados de AHA. Además, los títulos de anticuerpos que se detectaron en estos pacientes fueron muy altos, superiores a 1,2 según la lectura de densidad óptica del lector de ELISA. No obstante, a diferencia de nuestros resultados, otros autores han señalado que las técnicas serológicas muestran inconvenientes, como falsos positivos en población residente en zonas endémicas, ya que pueden detectarse anticuerpos durante años tras la infección (Patel & DeRidder 1989). Pero hay que resaltar además, que la serología muestra otra limitación, que es la posibilidad de que se produzcan falsos negativos. Estos resultados suelen producirse en las dos primeras semanas tras el inicio del cuadro clínico, antes de que empiece a ascender el título de anticuerpos (van Doorn *et al.* 2005; Knobloch & Mannweiler 1983; Stanley, Jr. 2003). El retraso en el diagnóstico del AHA puede conllevar un aumento de la morbilidad y la mortalidad de los enfermos, así como el inicio de tratamientos antibióticos innecesarios.

Por tanto, aunque en nuestro trabajo los resultados fueron similares, un resultado serológico positivo puede no ser diagnóstico de AHA, por lo que muchos expertos piensan que debe confirmarse por otro método, particularmente cuando existen títulos bajos de anticuerpos, que pueden deberse a una infección pasada. En este estudio, ocho enfermos con AHA eran inmigrantes procedentes de zonas endémicas, y la serología fue positiva en todos ellos, por lo que la PCR sirvió como técnica confirmatoria. Por otra parte, la técnica molecular puede convertirse en un método diagnóstico imprescindible para la identificación de la amebiasis importada, en viajeros de zonas no endémicas. Esta previsión se fundamenta en el hecho de que, cada vez con más frecuencia, los viajeros con sospecha de amebiasis, refieren antecedentes de varias estancias en países endémicos, por lo que pueden infectarse y desarrollar anticuerpos contra el parásito, complicando el diagnóstico de la amebiasis por

serología. Por tanto, la técnica de PCR debe considerarse de referencia en inmigrantes y, desde nuestro punto de vista, también en viajeros que visiten con frecuencia países en desarrollo.

Otro aspecto que debe destacarse en cuanto al diagnóstico de laboratorio del AHA, es la baja utilidad del examen microscópico directo. La observación de trofozoítos en el pus del absceso es un hallazgo poco frecuente. Según el trabajo de Zengzhu y colaboradores (1999), el examen microscópico mostró una sensibilidad del 19%, mientras que una técnica molecular basada en de PCR detectó el 100% de los casos. Así mismo, Tachibana y colaboradores (1992) obtuvieron una sensibilidad del 10,5% con la microscopía y un 100% de sensibilidad con la técnica de PCR.

Por otro lado, la apariencia macroscópica del pus del absceso de *pasta de anchoas* o color achocolatado, considerado diagnóstico de AHA en algunos estudios clásicos, puede observarse en otros tipos de patología hepáticas. Asimismo, el material del AHA, también puede tener otro aspecto, como en el caso de tres de los pacientes incluidos en este estudio, cuya punción tenía un aspecto blanco amarillento, que no fue considerado característico de amebiasis (Zengzhu *et al.* 1999).

También debe comentarse la utilidad de nuestra técnica de PCR en las muestras de heces. Algunos trabajos han defendido que puede diagnosticarse un AHA, si el enfermo muestra un absceso hepático y se observan amebas en sus heces. No obstante, la rentabilidad de la microscopía en heces debe considerarse muy limitada por sus bajas sensibilidad y especificidad. En nuestro estudio se analizaron las heces en busca de *E. histolytica* en seis de los enfermos diagnosticados de AHA. El examen microscópico del concentrado fue negativo en todos los casos, confirmando su baja rentabilidad. Por el contrario, la técnica de PCR fue positiva en el 50% de los casos analizados, lo que demuestra que puede ser útil en algunas ocasiones. Este aspecto es de especial interés, ya que la punción del absceso debe reservarse para casos concretos y no debe realizarse de una forma generalizada.

Por otra parte, se deben destacar otras oportunidades diagnósticas que ofrece el método de la PCR. Se han publicado trabajos en los que se ha analizado la sensibilidad de estas técnicas en muestras de orina y de sangre (Parija & Khairnar 2007). La sensibilidad es inferior que en las muestras de la punción hepática, pero en los casos en los que no esté indicado realizarse, por la localización anatómica del absceso o por su tamaño, la aplicación de la PCR a muestras de sangre o de orina puede ser útil para poder detectar el parásito.

Para finalizar con el AHA, debe comentarse la epidemiología de los enfermos con amebiasis extraintestinal. Los abscesos hepáticos suelen ser más frecuentes en hombres que en mujeres (Stanley, Jr. 2003). Nuestros datos confirman lo expuesto con anterioridad, ya que de los 15 enfermos con AHA, sólo cuatro casos fueron diagnosticados en mujeres. Al analizar los datos de los pacientes según su origen geográfico y la información demográfica disponible, las diferencias entre sexos se dieron principalmente en inmigrantes procedentes de zonas endémicas de amebiasis, diagnosticándose siete de los ocho casos en hombres. Sin embargo, en los viajeros, la distribución por sexos fue similar, con dos casos en hombres y otros dos en mujeres.

Por otra parte hay que destacar, que los abscesos diagnosticados en inmigrantes, se observaron mayoritariamente en pacientes de origen sudamericano, y sólo se detectaron dos en pacientes africanos. Lo mismo sucedió con los viajeros, ya que el 75% de los AHA de este grupo se dieron en enfermos que habían visitado Sudamérica, dos Venezuela y uno Costa Rica. Estas diferencias epidemiológicas podrían indicar una diferencia en la virulencia de las cepas de *E. histolytica*, ya descrita en otros trabajos con anterioridad (Haghighi *et al.* 2003). Según nuestros resultados, podría aceptarse que las cepas sudamericanas muestran una mayor capacidad invasora que las cepas del África subsahariana. Esta diferencia patogénica será de nuevo analizada en el apartado dedicado a discutir el objetivo tres del presente trabajo, que versó sobre la caracterización molecular de *E. histolytica*.

La segunda utilidad clínica de la técnica de PCR que se analizó en nuestro estudio, fue su fiabilidad a la hora de diagnosticar la amebiasis intestinal. Para ello se utilizaron muestras de heces procedentes de enfermos con amebiasis intestinal, así como de personas con quistes de amebas comensales.

En el diagnóstico de la amebiasis intestinal, la *nested*-PCR mostró una mayor sensibilidad que el examen microscópico como ya han descrito otros autores previamente (Fotedar *et al.* 2007a). La técnica de PCR detectó todos los casos de amebiasis intestinal, mientras que sólo se observaron formas compatibles con *E. histolytica*/*E. dispar* en el 84% de los pacientes con la infección. Esta cifra es algo superior a la observada en otras series, ya que la sensibilidad del examen microscópico se situó en un 60-70% de los casos analizados (Blessmann *et al.* 2002). Hay que resaltar, que sólo en un paciente, cuyo examen microscópico se hizo en la muestra fresca sin concentrar, se observaron trofozoítos. En el resto de pacientes con microscopía positiva se detectaron quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* en el concentrado de las heces. En dos enfermos, el examen microscópico del concentrado fue negativo, no observándose ni trofozoítos ni quistes. Esto pudo deberse a la baja sensibilidad de la microscopía, a la escasa o intermitente excreción de quistes por las heces, o a que sólo eliminaran trofozoítos y estos hubieran sido destruidos por el método de concentración (Gonzalez-Ruiz *et al.* 1994). La concentración de la muestra de heces se realiza rutinariamente en la mayoría de los laboratorios de microbiología de los hospitales, por lo que debe tomarse en consideración que un resultado negativo en el examen microscópico no descarta la presencia de *E. histolytica*. Además, otro dato que muestra la mayor sensibilidad de la técnica de PCR frente al examen microscópico en este estudio, son los diez casos con un resultado del examen microscópico de las heces negativo y que por la técnica de PCR se consiguió amplificar el ADN de *E. dispar*.

La elevada sensibilidad de la técnica molecular permite concluir que si se utiliza de forma rutinaria en muchas ocasiones, no serían necesarios los estudios seriados con tres muestras de heces, como se suele recomendar

en los exámenes parasitológicos clásicos. Esto significaría un gran ahorro de tiempo en los laboratorios asistenciales, lo que siempre debe tomarse en cuenta, en nuestro Sistema Nacional de Salud.

Por otra parte se debe resaltar, que el examen microscópico no puede diferenciar entre *E. histolytica*, la ameba patógena, y el comensal más frecuente, *E. dispar*. De ahí que los resultados de la microscopía tienen que informarse indicando que las estructuras observadas son compatibles con *E. histolytica/E. dispar*. Esto último nos lleva a afirmar, que el diagnóstico de la amebiasis intestinal no puede basarse únicamente en la microscopía. El examen microscópico sólo puede utilizarse como una técnica diagnóstica presuntiva, que debe confirmarse con otro método, como la técnica de PCR que presentamos en este trabajo. Esta afirmación queda confirmada con los resultados obtenidos en la población estudiada que no presentaba amebiasis intestinal. Ya que en las muestras de heces, procedentes de 76 personas, en las que se habían observado quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar*, el 83% estaban parasitados por la especie comensal *E. dispar*, y sólo un 14% estaba infectado con la ameba patógena *E. histolytica*. Por otra parte, en los 71 pacientes en los que se observaron quistes de amebas sin precisar la especie, se obtuvieron resultados comprables, ya que en un 56% se detectó *E. dispar* por la técnica de PCR. Además, en ningún caso se amplificó ADN de *E. histolytica*.

Por tanto, nuestro trabajo demuestra que la prevalencia de *E. dispar* es mucho mayor que la de *E. histolytica* como describen otros autores (Verweij *et al.* 2003; Solaymani-Mohammadi *et al.* 2006b; Visser *et al.* 2006; Kebede *et al.* 2004a). Por lo que debe señalarse, que parece obvio que, actualmente, puede existir una sobreestimación de la amebiasis intestinal, ya que muchos centros sanitarios sólo emplean el examen parasitológico de heces como método diagnóstico. Esta sobreestimación puede conducir a que no se diagnostiquen otras enfermedades y que se pauten tratamientos antiparasitarios innecesarios (Leiva *et al.* 2006).

Otro factor a tomar en consideración es la dificultad que presenta el estudio parasitológico por microscopía en la población inmigrante procedente de zonas endémicas de amebiasis. En esta población es muy frecuente observar quistes de diferentes especies de amebas en el concentrado de las heces, lo que complica el diagnóstico del complejo *E. histolytica/E. dispar*. Además, muchos hospitales no disponen de un micrómetro en el ocular, por lo que es prácticamente imposible distinguir *E. histolytica/E. dispar* de *E. hartmanni* y, en ocasiones, de *E. coli*. Lo que se confirma con los resultados de la técnica de PCR obtenidos en el presente trabajo, ya que en el 44% de las muestras de heces en las que se observaron quistes de amebas no eran *E. histolytica* ni *E. dispar*. Estos resultados también concuerdan con los comunicados por otros autores (Kebede *et al.* 2003; Kebede *et al.* 2004b), que coinciden en señalar, que la identificación del complejo *E. histolytica/E. dispar* mediante examen microscópico, requiere de personal experto en microscopía parasitológica, que no abunda en la mayoría de los centros sanitarios donde se atienden por primera vez a estos enfermos. Este hecho queda reflejado también por las muestras de heces (16 casos) que fueron remitidas a nuestro laboratorio para descartar amebiasis tras un examen microscópico compatible con *E. histolytica/E. dispar*, que una vez analizadas en nuestro centro fueron clasificadas como heces con amebas no pertenecientes al complejo *E. histolytica/E. dispar*. En todos estos casos, el resultado de la técnica de PCR fue negativo.

Otro dato destacable es el análisis de las infecciones mixtas por *E. histolytica/E. dispar*. En la literatura no existe acuerdo sobre la frecuencia de estos casos. En nuestro estudio hubo un caso de infección mixta, en la muestra de heces de un paciente procedente de Guinea Ecuatorial. La técnica de PCR descrita en este trabajo fue capaz de detectar las dos especies, lo que muestra una posible utilidad adicional para este método.

Otro aspecto que debe comentarse son los resultados en las muestras de heces procedentes del colectivo de viajeros a zonas endémicas. Se analizaron 105 muestras de heces de viajeros con distintos síndromes diarreicos o intestinales, para descartar la presencia de *E. histolytica*. En

todas estas muestras el examen microscópico fue negativo. Por otra parte, sólo en un caso se obtuvo un resultado positivo, mediante la técnica de PCR. Este dato nos hace meditar sobre la necesidad de descartar la amebiasis de forma rutinaria en los viajeros por PCR. Quizá se deberían proponer protocolos que incluyan una información clínica más detallada, y de esa forma reservar la técnica molecular para casos seleccionados, con una alta sospecha de infección amebiana. Aunque se tiene que reconocer, que en muchas ocasiones, la clínica es indistinguible de otras enfermedades intestinales, además de ser muy variable según cada caso.

En cuanto a la comparación entre la técnica molecular de PCR y la detección de anticuerpos en el diagnóstico de la amebiasis intestinal, pueden comentarse algunos resultados. En nuestro trabajo, la PCR mostró mejores resultados que la serología. De los ocho pacientes en los que se realizó la detección de anticuerpos, siete tuvieron un resultado positivo a títulos altos. La sensibilidad de la técnica serológica se situó en el 87,5%. Hay que destacar que dos de los casos en los que la serología fue positiva eran portadores asintomáticos de *E. histolytica*, lo que demuestra la buena sensibilidad de estas técnicas. Por lo tanto, las persona infectadas por *E. histolytica* pueden identificarse mediante la detección de un título elevado de anticuerpos por una técnica serológica y la visión de formas compatibles con *E. histolytica*/*E. dispar* en el examen microscópico directo, según los datos obtenidos en este trabajo, que coinciden con lo publicado por otros autores previamente (Pillai *et al.* 1999; Visser *et al.* 2006).

Estos resultados demuestran que la serología sigue siendo un método fiable para el diagnóstico, cuando se obtiene un título alto de anticuerpos. No obstante debe indicarse que, sobretodo, en población procedente de zonas endémicas, la serología puede tener un valor predictivo positivo más bajo, por lo que se debe disponer de métodos que confirmen el diagnóstico de amebiasis. Uno de estos métodos es la detección del parásito por PCR. Puede concluirse, por tanto, que el mejor enfoque para

el diagnóstico de la amebiasis puede ser la utilización de técnicas serológicas y la detección del parásito por técnicas moleculares.

En relación a la epidemiología de los enfermos con amebiasis intestinal, existen algunas diferencias con la del AHA, aunque debe destacarse que los datos analizados no constituyen un estudio de vigilancia epidemiológica activa, por lo que pueden existir sesgos. El AHA fue más frecuente en varones, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en cuanto al sexo en la amebiasis intestinal. La edad media de los pacientes con amebiasis intestinal fue inferior a la del AHA (33 años, intervalo 14-68 vs. 37,5 años, intervalo 28-62). Debe señalarse que los dos casos autóctonos de AHA fueron diagnosticados en personas con edades superiores (57 y 62 años) a las observadas en los otros casos de AHA, que estaban comprendidas entre 28 y 40 años.

En relación a la procedencia de los pacientes con amebiasis intestinal, hay que destacar que nueve eran inmigrantes africanos, siendo ocho de Guinea Ecuatorial, tres (37,5%) de los cuales estaban asintomáticos. Este dato indica que este tipo de amebiasis puede ser muy frecuente en los pacientes procedentes de África ecuatorial, lo que debería tomarse en cuenta en el diagnóstico diferencial de los síndromes diarreicos, que se detectan en enfermos de esta procedencia. Incluso podría plantearse realizar estudios en inmigrantes asintomáticos que vengan de esta área, para evitar que el parásito se reintroduzca en España.

Por otra parte, no se diagnosticó amebiasis intestinal en ningún paciente de origen sudamericano. Sin embargo, tres colombianos y tres ecuatorianos fueron diagnosticados de amebiasis diseminada, lo que indica que esta población está infectada por *E. histolytica*. La capacidad invasora de las cepas sudamericanas parece superior que la de las africanas, aspecto que se discutirá posteriormente. Respecto a la falta de diagnósticos de amebiasis intestinal en sudamericanos no tenemos una explicación definitiva. Es probable que se deba a que no se ha estudiado un número de muestras suficiente. Muchas de las heces procedentes de sudamericanos tenían *E. dispar*, con porcentajes similares a los

observados en heces de africanos. Desde nuestro punto de vista, este dato reafirma que la ausencia de *E. histolytica* en heces de sudamericanos puede deberse a un sesgo epidemiológico.

Para finalizar, hay que comentar que cuatro casos, una disentería y tres AHA, no se diagnosticaron ni en viajeros ni en inmigrantes, considerándose casos autóctonos. El caso de disentería y uno de los AHA fueron observados en varones que habían mantenido relaciones sexuales con prostitutas, procedentes de zonas endémicas de amebiasis. Uno de ellos refirió prácticas de sexo oral. En el otro caso no se dispuso de información a este respecto. La transmisión sexual de la amebiasis ha sido reconocida desde hace tiempo (Phillips *et al.* 1981) pero la mayoría de los casos se refieren a hombres homosexuales con o sin infección por HIV (Thompson, Jr. *et al.* 1983; Hung *et al.* 2005), estando bien documentada la asociación entre infección por *E. histolytica* y homosexualidad. Sin embargo, debe indicarse que las prácticas de sexo oral entre parejas heterosexuales también deben ser consideradas un factor de riesgo para la transmisión de la amebiasis, como se ha documentado en algunos trabajos recientemente publicados (Díaz-González *et al.* 2005). Por tanto, se debe estar en guardia ante el posible aumento de la transmisión de *E. histolytica* entre parejas heterosexuales, ya que el número de personas infectadas por *E. histolytica* está creciendo en los países desarrollados debido al fenómeno migratorio.

En relación con la transmisión de persona a persona sin contacto sexual en países desarrollados, se han publicado casos de transmisión de *E. histolytica* dentro de la misma familia (Gatti *et al.* 1995; Vreden *et al.* 2000). Estos casos nos advierten sobre la posibilidad de que la amebiasis autóctona pueda aumentar en próximos años, dado que en España vive cada vez un mayor número de inmigrantes procedentes de zonas endémicas, por lo que la transmisión de persona a persona de la enfermedad podría verse incrementada. Un dato que debe tomarse en consideración es que muchos de estos inmigrantes trabajan en puestos relacionados con la agricultura, la industria de los alimentos, la hostelería y en el servicio doméstico, lo que podría tener consecuencias directas

sobre la prevalencia de la amebiasis autóctona. Desde nuestro punto de vista, la amebiasis es una parasitosis emergente, que en los próximos años podría convertirse en un problema de salud pública de primera magnitud, por lo que deberían desarrollarse protocolos de control y erradicación en emigrantes.

Según lo expuesto en el párrafo anterior, la amebiasis debería incluirse, ya en la actualidad, en el diagnóstico diferencial de cuadros clínicos compatibles, incluso sin el antecedente epidemiológico de viajes o de inmigración.

Los otros dos casos de amebiasis autóctona son muy interesantes desde el punto de vista epidemiológico. Se diagnosticaron en una mujer de origen gallego y en un varón madrileño, en los que no pudo objetivarse ningún antecedente de interés. Díaz-González y colaboradores (2005) publicaron la revisión más completa sobre AHA autóctono en nuestro país. Se incluyeron diez casos, diagnosticados en los últimos 20 años. En seis de ellos no hubo antecedente de contagio de persona a persona. En algunos de estos casos sin antecedentes epidemiológicos, posteriores entrevistas demostraron la existencia de contactos, no admitidos previamente, con personas procedentes de zonas endémicas. En otros, como los casos de este estudio, no se consiguió encontrar una explicación para el contagio. Otros autores también han publicado casos autóctonos de amebiasis intestinal (Pérez Trallero *et al.* 1985). Aunque no debe descartarse que algunos de estos casos de amebiasis fueran erróneamente diagnosticados, particularmente las infecciones que fueron detectadas por microscopía, ya que es probable que los quistes que se observaron fueran de *E. dispar* y no de *E. histolytica*. Esta posibilidad ha quedado reforzada con los resultados de nuestro estudio, ya que cinco casos en españoles sin antecedentes de viajes, en los que se observaron quistes de *E. histolytica*/*E. dispar*, fueron identificados con portadores de *E. dispar* cuando se realizó la técnica molecular de PCR.

Esto permite especular sobre la presencia del parásito en España. *E. histolytica* es un parásito cosmopolita. La presencia de esta ameba en

España podría explicarse por las condiciones climatológicas de humedad elevada y temperaturas suaves de algunas regiones de nuestro país, que favorecen la persistencia de las formas quísticas. Sin embargo, las condiciones de los saneamientos y las instalaciones de tratamiento de aguas de España deberían prevenir el contagio de la amebiasis, a diferencia de los países endémicos donde las condiciones higiénicas son deficientes. Recientemente, algunos autores han publicado brotes de amebiasis en zonas de Europa con deficiencias en sus instalaciones de tratamiento de aguas (Barwick *et al.* 2002). Esto podría aplicarse a algunas áreas rurales de España. Además, como se indicó anteriormente, el aumento de inmigrantes con *E. histolytica*, o de viajeros que adquieren la ameba, en zonas endémicas, podría incrementar la presencia del parásito en el medio ambiente, por lo que podrían producirse brotes epidémicos en los próximos años.

Hasta la fecha, no se han realizado estudios fiables sobre la seroprevalencia de la amebiasis en España, por lo que no se conocen los porcentajes de población infectada. Sólo se ha publicado un estudio realizado en Huelva, en 1998. Se encontraron 19 (1,79%) casos con serología positiva, aunque sólo un caso tenía un título de anticuerpos alto, entre las 1056 personas analizadas (Perea *et al.* 1998) Es probable que en los próximos años sean necesarios más estudios, que nos ayuden a conocer la nueva realidad epidemiológica de esta infección emergente.

Para finalizar debe resaltarse que las técnicas basadas en el análisis del ADN como la PCR presentada en este estudio, tienen una elevada sensibilidad y una especificidad indiscutible, por lo que deben convertirse en las técnicas de elección tanto en el diagnóstico de la amebiasis como en los estudios epidemiológicos (Mirelman *et al.* 1997; Gonin & Trudel 2003). La aplicación de esta técnica en un mayor número de casos, podría revelar la verdadera prevalencia de la amebiasis, además de ayudar a conocer aspectos polémicos como la presencia endémica del parásito en nuestro país.

### **3. Caracterización genotípica de las cepas clínicas de *E. histolytica* de los pacientes con amebiasis**

Las infecciones por *E. histolytica* son muy variables desde el punto de vista clínico. Muchos enfermos no desarrollan la enfermedad, siendo portadores asintomáticos. En otras ocasiones, se producen diarreas y otros síntomas intestinales, que varían desde cuadros leves a casos muy intensos, que pueden poner en peligro la vida del paciente. Por último, en algunos enfermos se producen cuadros extraintestinales, que llegan a causar AHA. Los factores que determinan la evolución de la infección por *E. histolytica* son desconocidos. Existen varias posibilidades, ya que pueden depender de la cepa infecciosa, del hospedador, o ser una combinación de ambos factores, ya que, probablemente, sea una interacción entre factores genéticos, inmunológicos, nutricionales, de la flora entérica del hospedador y de la existencia de distintos genotipos del parásito que producen la enfermedad.

La influencia del genotipo del parásito es uno de los factores que se está analizando en la actualidad. La diferencia en la capacidad patógena de las distintas cepas podría relacionarse con su pertenencia a diferentes tipos dentro de la especie. Recientemente se han publicado algunos estudios en los que parece que se ha encontrado una asociación entre los diferentes genotipos de *E. histolytica* y su virulencia (Ali *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esa línea. Aunque el número de cepas incluidas en el estudio no es lo suficientemente elevado como para extraer conclusiones definitivas y además, en este trabajo sólo se ha secuenciado el locus 1-2 (actualmente llamado DA) de los seis STR que están descritos en la actualidad. A continuación se discute algunas de las tendencias observadas.

En primer lugar, los genotipos más frecuentes fueron el 5DA, el 6DA y el 15DA. El tipo 5DA se asoció, aunque no significativamente, con el AHA y debe destacarse su relación con pacientes de origen ecuatoriano. El tipo

6DA fue el más frecuente de todos y también produjo un número elevado de AHA, encontrándose una relación que se situó muy cercana a la significación estadística ( $P=0,08$ ). Este grupo tiene una distribución geográfica amplia ya que se encontró en muestras procedentes de varios continentes, aunque debe indicarse que los tres pacientes colombianos diagnosticados de AHA tenían cepas pertenecientes a este genotipo. En cuanto al género de los enfermos, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en este grupo. No obstante, dos de las mujeres que padecían AHA presentaban una condición favorecedora, en concreto una estaba embarazada y la otra era VIH+. Por otra parte, el genotipo 15DA mostró unas características clínicas que pueden considerarse poco virulentas, ya que sólo se observó en un caso de AHA ( $P=0,05$ ), en un paciente que no era originario de zonas endémicas de amebiasis. En cuanto a su origen geográfico, se encontró una relación con los pacientes de origen guineano. No se observaron vínculos significativos cuando se analizaron los casos por sexos.

Por último, deben destacarse los cuatro casos en los que las cepas aisladas no pudieron agruparse en ninguno de los genotipos existentes. Este dato nos indica que no disponemos aún de información suficiente sobre la distribución geográfica de *E. histolytica*.

En cuanto a la tipificación de las cepas de *E. histolytica* por el gen SREHP, se observó una gran variabilidad, sin que se detectaran asociaciones entre tipos de secuencias y origen geográfico de las cepas o cuadro clínico de los enfermos.

Estos resultados no coinciden con lo publicado por Ayeh-Kumi y colaboradores (2001) que encontraron un vínculo entre genotipos del gen SREHP y la presentación clínica de la amebiasis, diarrea o AHA. Debe señalarse que en este trabajo se incluyeron muestras de una zona geográfica, Bangladesh, mientras que en nuestro trabajo las muestras eran de pacientes de distintas partes del mundo. Por otra parte, nuestros resultados coinciden con los publicados por Haghghi y colaboradores (2002), que encontraron gran variabilidad en muestras de origen japonés.

Es necesario realizar estudios epidemiológicos coordinados que permitan analizar un mayor número de cepas. Deberían incluirse cepas representativas de cada zona geográfica, para poder obtener resultados significativos. La amebiasis se ha convertido en una infección emergente en España y en otras zonas de Europa, por lo que la información epidemiológica resulta crucial a la hora de planificar qué medidas de control deben aplicarse en nuestros países. Desde nuestro punto de vista deben realizarse trabajos multicéntricos en los que colaboren expertos en salud pública, centros hospitalarios y laboratorios de parasitología, ya que es el único modo de obtener los datos necesarios para conocer la prevalencia de la infección en inmigrantes y en viajeros, la distribución de cada genotipo y el mejor modo de prevenir la infección.

***CONCLUSIONES***

1. El diagnóstico de la amebiasis no puede basarse exclusivamente en la microscopía desde la separación formal de *E. histolytica* de *E. dispar*. Por lo tanto, se necesitan métodos confirmatorios entre los que se encuentran las técnicas de detección de ácidos nucleicos.
2. En el diagnóstico de la amebiasis intestinal la técnica de PCR mostró una sensibilidad superior a la de la microscopía y a la de la serología. El método molecular fue capaz de distinguir entre *E. histolytica*, la especie patógena, y *E. dispar*, la comensal.
3. La prevalencia de *E. dispar* fue superior a la de *E. histolytica* en todos los grupos estudiados. Este dato indica que si no se realiza una técnica que diferencie entre las dos especies, la mayor parte de los diagnósticos de amebiasis serán erróneos y se pautarán tratamientos innecesarios.
4. La técnica de PCR descrita en el estudio tiene una sensibilidad diagnóstica similar a la de la serología en el caso del AHA. Además, presenta la ventaja sobre la serología de que evita los falsos positivos en inmigrantes, así como los falsos negativos que suelen producirse durante la primera semana de la infección. Por otro lado, la obtención del ADN de la cepa infecciosa permite realizar estudios de caracterización epidemiológica.
5. La alta rentabilidad de la técnica de PCR en el material del absceso nos lleva a recomendar su uso como método diagnóstico de referencia en los casos sospechosos de AHA. También puede utilizarse en otras muestras como sangre, orina y heces, aunque con una sensibilidad inferior.
6. La amebiasis se ha convertido en una infección emergente en España, asociada al fenómeno migratorio y al turismo a zonas endémicas. Por ello, debe realizarse el diagnóstico diferencial en todos los cuadros clínicos compatibles, empleando técnicas con una

rentabilidad diagnóstica elevada, como la detección de ácidos nucleicos.

7. No se han realizado estudios serológicos de amebiasis a nivel nacional en nuestro país, por lo que no puede asegurarse cuál es la prevalencia de la infección autóctona. Los casos descritos recientemente sin antecedente epidemiológico no deberían considerarse autóctonos, ya que la circulación del parásito está aumentando en nuestro medio debido al incremento de las personas infectadas.
  
8. La caracterización genotípica muestra que existe un elevado grado de variabilidad entre las distintas cepas de *E. histolytica*, y una posible relación entre algunos genotipos del parásito, la capacidad virulenta y su origen geográfico. No obstante, es necesario realizar estudios epidemiológicos coordinados que permitan analizar un mayor número de cepas. Asimismo, deben realizarse trabajos multicéntricos, ya que es el único modo de obtener los datos necesarios para conocer la prevalencia de esta parasitosis, la distribución de cada genotipo y el mejor modo de prevenir la infección.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

**Ackers J P.** 2002. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J.Biosci* 27(6 (3)): 573-578.

**Aguilera P, Barry T, & Tovar J.** 2007. *Entamoeba histolytica* mitosomes: Organelles in search of a function. *Exp.Parasitol* .

**Aguirre A, Molina S, Blotkamp C, Verveij J, Vinuesa T, Valls ME, Guhl F, Polderman A, Jimenez de Anta MT, Corachan M, Gonzalez-Ruiz A, Frame IA, & Warhurst D.** 1997. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical specimens by PCR-SHELA. *Arch.Med.Res.* 28 Spec No: 282-284.

**Aguirre A, Warhurst DC, Guhl F, & Frame IA.** 1995. Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans.R Soc Trop Med Hyg.* 89(2): 187-188.

**Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA, Jr., Haque R, & Clark CG.** 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg.Infect.Dis* 9(5): 580-584.

**Ali IK, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA, Jr., & Clark CG.** 2007. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 45(2): 285-289.

**Ali IK, Zaki M, & Clark CG.** 2005. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 43(12): 5842-5847.

**Allason-Jones E, Mindel A, Sargeant P, & Williams P.** 1986. *Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men. *N Engl J Med* 315(6): 353-356.

**Anonymous.** 1997. *Entamoeba* taxonomy. *Bull.WHO* 75: 291-292.

**Anton E.** 2005. An elderly man with multiple hepatic lesions: other concepts on amebic liver abscess. *J Am Geriatr.Soc* 53(6): 1082.

**Ayeh-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA, Jr., & Haque R.** 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp.Parasitol* 99(2): 80-88.

**Barwick RS, Uzicanin A, Lareau S, Malakmadze N, Imnadze P, Iosava M, Ninashvili N, Wilson M, Hightower AW, Johnston S, Bishop H, Petri WA, Jr., & Juranek DD.** 2002. Outbreak of amebiasis in Tbilisi, Republic of Georgia, 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 67(6): 623-631.

**Bhattacharya A, Arya R, Clark CG, & Ackers JP.** 2000. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology* 120 ( Pt 1): 31-35.

**Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS, & Soldo AT.** 1989. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool.* 36(5): 455-458.

**Bhattacharya S, Som I, & Bhattacharya A.** 1998. The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol Today* 14(5): 181-185.

**Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, & Tannich E.** 2003. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol.* 41(10): 4745-4750.

- Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, Alla MD, Jackson TF, Ravdin JI, & Tannich E.** 2002. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J.Clin.Microbiol.* 40(12): 4413-4417.
- Blessmann J, Le Van A, & Tannich E.** 2006. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. *Arch.Med Res* 37(2): 270-272.
- Bruchhaus I & Tannich E.** 1993. Analysis of the genomic sequence encoding the 29-kDa cysteine-rich protein of *Entamoeba histolytica*. *Trop Med Parasitol* 44(2): 116-118.
- Bruckner DA.** 1992. Amebiasis. *Clin.Microbiol.Rev.* 5(4): 356-369.
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, & Ortiz-Ortiz L.** 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 50(4): 412-419.
- Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, & Chezzi C.** 2006. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans.R Soc Trop Med Hyg.* 100(5): 450-457.
- Casas I, Powell L, Klapper PE, & Cleator GM.** 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 53(1): 25-36.
- Cavalier-Smith T.** 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.* 73(3): 203-266.
- Clark CG.** 1995. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *J Eukaryot.Microbiol.* 42(5): 590-593.
- Clark CG & Diamond LS.** 1991a. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol.Biochem.Parasitol* 49(2): 297-302.
- Clark CG & Diamond LS.** 1991b. The Laredo strain and other '*Entamoeba histolytica*-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol.Biochem.Parasitol* 46(1): 11-18.
- Clark CG & Diamond LS.** 1992. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch.Med Res* 23(2): 15-16.
- Clark CG & Diamond LS.** 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp.Parasitol* 77(4): 450-455.
- Clark CG & Diamond LS.** 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin.Microbiol.Rev.* 15(3): 329-341.
- Cruz-Reyes JA, Spice WM, Rehman T, Gisborne E, & Ackers JP.** 1992. Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 104 ( Pt 2): 239-246.
- Diamond LS.** 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 134: 336-337.
- Diamond LS.** 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J Parasitol* 54(5): 1047-1056.

- Diamond LS & Clark CG.** 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J.Eukaryot.Microbiol.* 40(3): 340-344.
- Diamond LS, Harlow DR, & Cunnick CC.** 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 72(4): 431-432.
- Diaz-Gonzalvez E, Manzanedo-Terán B, López-Vélez R, & Drona F.** 2005. Absceso hepático amebiano autóctono: caso clínico y revisión de la literatura médica. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 23(3): 179-181.
- Doganci L, Tanyuksel M, & Doganci T.** 2004. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. *World J.Gastroenterol.* 10(8): 1231.
- Edman U, Meraz MA, Rausser S, Agabian N, & Meza I.** 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Exp.Med* 172(3): 879-888.
- Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, & Legakis N.** 2000. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 94(3): 233-240.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, & Harkness J.** 2007a. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. *Clin Microbiol.Rev* 20(3): 511-32, table.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, & Harkness J.** 2007b. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and Entamoeba moshkovskii in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol.* 45(3): 1035-1037.
- Furrows SJ, Moody AH, & Chiodini PL.** 2004. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Pathol.* 57(12): 1264-1266.
- Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, & Shimizu RY.** 1982. Comparison of indirect fluorescent-antibody amoebic serology with counterimmunoelectrophoresis and indirect hemagglutination amoebic serologies. *J Clin Microbiol.* 15(4): 603-605.
- Garcia LS, Shimizu RY, & Bernard CN.** 2000. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 38(9): 3337-3340.
- Garcia-Forcada A, Sans M, Gascon J, Valls ME, Bru C, & Corachan M.** 1995. Absceso hepático amebiano:revisión de 13 casos. *Med.Clin.(Barc.)* 105(14): 537-540.
- Gathiram V & Jackson TF.** 1987. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S.Afr.Med J* 72(10): 669-672.
- Gatti S, Cevini C, Bruno A, Novati S, & Scaglia M.** 1995. Transmission of *Entamoeba histolytica* Within A Family Complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89(4): 403-405.
- Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo G, Bruno A, Maserati R, Bisoffi Z, & Scaglia M.** 2002. 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.* 67(1): 123-127.

- Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez OA, Santos-Preciado JI, Ganguly C, Lohia A, Reed S, & Samuelson J.** 2000. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol.* 38(10): 3815-3821.
- Goldmeier D, Sargeant PG, Price AB, Munday PE, Billington O, Dixon I, Borriello P, Carder JM, Shaw A, Hilton J, & .** 1986. Is *Entamoeba histolytica* in homosexual men a pathogen? *Lancet* 1(8482): 641-644.
- Gonin P & Trudel L.** 2003. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin.Microbiol.* 41(1): 237-241.
- Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Aguirre A, Castanon G, Hall A, Guhl F, Ruiz-Palacios G, Miles MA, & Warhurst DC.** 1994. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J.Clin.Pathol.* 47(3): 236-239.
- Gutierrez-Cisneros MJ, Sineiro PE, Garate OT, & Fuentes C, I.** 2007. Absceso hepático amebiano autóctono: diagnóstico microbiológico por PCR. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin* 25(7): 493-494.
- Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, & Nozaki T.** 2002. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol.* 40(11): 4081-4090.
- Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, & Nozaki T.** 2003. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J.Clin.Microbiol.* 41(8): 3748-3756.
- Haque R, Ali IK, Akther S, & Petri WA, Jr.** 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol.* 36(2): 449-452.
- Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, & Petri WA, Jr.** 1997. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect.Dis* 175(3): 734-736.
- Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, Lyerly D, & Petri WA, Jr.** 2000. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol.* 38(9): 3235-3239.
- Haque R, Neville LM, Hahn P, & Petri WA, Jr.** 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J.Clin.Microbiol.* 33(10): 2558-2561.
- Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SM, Mondal D, Hout E, & Petri WA, Jr.** 2007. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg.* 76(4): 713-717.
- Heckendorn F, N'Goran EK, Felger I, Vounatsou P, Yapi A, Oettli A, Marti HP, Dobler M, Traore M, Lohourignon KL, & Lengeler C.** 2002. Species-specific field testing of *Entamoeba* spp. in an area of high endemicity. *Trans.R Soc Trop Med Hyg.* 96(5): 521-528.
- Hira PR, Iqbal J, Al Ali F, Philip R, Grover S, D'Almeida E, & Al Enezi AA.** 2001. Invasive amebiasis: challenges in diagnosis in a non-endemic country (Kuwait). *Am J Trop Med Hyg.* 65(4): 341-345.

**Hughes MA & Petri WA, Jr.** 2000. Amebic liver abscess. *Infect.Dis Clin North Am* 14(3): 565-82, viii.

**Hung CC, Chen PJ, Hsieh SM, Wong JM, Fang CT, Chang SC, & Chen MY.** 1999. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. *AIDS* 13(17): 2421-2428.

**Hung CC, Deng HY, Hsiao WH, Hsieh SM, Hsiao CF, Chen MY, Chang SC, & Su KE.** 2005. Invasive amoebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch.Intern.Med.* 165(4): 409-415.

**Huston CD, Haque R, & Petri WA, Jr.** 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert.Rev Mol.Med* 1999: 1-11.

**Kebede A, Verweij J, Dorigo-Zetsma W, Sanders E, Messele T, van Lieshout L, Petros B, & Polderman T.** 2003. Overdiagnosis of amoebiasis in the absence of *Entamoeba histolytica* among patients presenting with diarrhoea in Wonji and Akaki, Ethiopia. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 97(3): 305-307.

**Kebede A, Verweij JJ, Endeshaw T, Messele T, Tasew G, Petros B, & Polderman AM.** 2004a. The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 98(1): 43-48.

**Kebede A, Verweij JJ, Petros B, & Polderman AM.** 2004b. Short communication: Misleading microscopy in amoebiasis. *Trop.Med.Int.Health* 9(5): 651-652.

**Khan U, Mirdha BR, Samantaray JC, & Sharma MP.** 2006. Detection of *Entamoeba histolytica* using polymerase chain reaction in pus samples from amebic liver abscess. *Indian J.Gastroenterol.* 25(2): 55-57.

**Knappik M, Borner U, & Jelinek T.** 2005. Sensitivity and specificity of a new commercial enzyme-linked immunoassay kit for detecting *Entamoeba histolytica* IgG antibodies in serum samples. *Eur J Clin Microbiol.Infect.Dis* 24(10): 701-703.

**Knobloch J & Mannweiler E.** 1983. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 32(4): 727-732.

**Kraoul L, Adjmi H, Lavarde V, Pays JF, Tourte-Schaefer C, & Hennequin C.** 1997. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol.* 35(6): 1530-1532.

**Leiva B, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, & Linder E.** 2006. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch.Med.Res.* 37(4): 529-534.

**Li E & Stanley SL, Jr.** 1996. Protozoa. Amebiasis. *Gastroenterol.Clin North Am* 25(3): 471-492.

**Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, & et al.** 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433(7028): 865-868.

**Mirelman D, Nuchamowitz Y, & Stolarsky T.** 1997. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J.Clin.Microbiol.* 35(9): 2405-2407.

- Moran P, Ramos F, Ramiro M, Curiel O, Gonzalez E, Valadez A, Gomez A, Garcia G, Melendro EI, & Ximenez C.** 2005. Infection by human immunodeficiency virus-1 is not a risk factor for amebiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 73(2): 296-300.
- Nunez YO, Fernandez MA, Torres-Nunez D, Silva JA, Montano I, Maestre JL, & Fonte L.** 2001. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 64(5-6): 293-297.
- Oh MD, Lee K, Kim E, Lee S, Kim N, Choi H, Choi MH, Chai JY, & Choe K.** 2000. Amoebic liver abscess in HIV-infected patients. *AIDS* 14(12): 1872-1873.
- Paglia MG & Visca P.** 2004. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. *Acta Trop* 92(3): 273-277.
- Parija SC & Khairnar K.** 2007. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiol.* 7: 41.
- Patel AS & DeRidder PH.** 1989. Amebic colitis masquerading as acute inflammatory bowel disease: the role of serology in its diagnosis. *J Clin Gastroenterol.* 11(4): 407-410.
- Perea R, Bassas E, Lepe JA, Lombardo M, & Garces M.** 1998. Prevalencia de anticuerpos frente a *Entamoeba histolytica* en la zona norte de la provincia de Huelva. *Med.Clin.(Barc.)* 110(7): 275.
- Pérez Trallero E, Cilla Eguiluz G, Urbieto Egaña M, & Muñoz Baroja I.** 1985. Infecciones autóctonas por *Entamoeba histolytica*. *Medicina Clínica* 85(6): 56.
- Petri WA, Jr., Jackson TF, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, & Mirelman D.** 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect.Immun.* 58(6): 1802-1806.
- Phillips SC, Mildvan D, William DC, Gelb AM, & White MC.** 1981. Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venereal-disease-clinic population. *N.Engl.J.Med.* 305(11): 603-606.
- Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, & Kain KC.** 1999. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin.Infect.Dis.* 29(5): 1315-1318.
- Que X & Reed SL.** 1991. Nucleotide sequence of a small subunit ribosomal RNA (16S-like rRNA) gene from *Entamoeba histolytica*: differentiation of pathogenic from nonpathogenic isolates. *Nucleic Acids Res* 19(19): 5438.
- Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, & da Silva AJ.** 2005. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 43(11): 5491-5497.
- Ramos F, Moran P, Gonzalez E, Garcia G, Ramiro M, Gomez A, DE Leon MC, Melendro EI, Valadez A, & Ximenez C.** 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. *Exp.Parasitol* 110(3): 327-330.
- Ramos F, Zurabian R, Moran P, Ramiro M, Gomez A, Clark CG, Melendro EI, Garcia G, & Ximenez C.** 1999. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans.R Soc Trop Med Hyg.* 93(3): 335-336.

- Ravdin JI.** 2000. Amebiasis. Ravdin, J. I. (2): 1-186. Imperial College Press. Tropical Medicine. Pasvol, G and Hoffman, SL.
- Ravdin JI, Jackson TF, Petri WA, Jr., Murphy CF, Ungar BL, Gathiram V, Skilogiannis J, & Simjee AE.** 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Infect.Dis* 162(3): 768-772.
- Restrepo MI, Restrepo Z, Elsa Villareal CL, Aguirre A, & Restrepo M.** 1996. Diagnostic tests for amoebic liver abscess: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Rev Soc Bras.Med Trop* 29(1): 27-32.
- Rivera WL, Santos SR, & Kanbara H.** 2006. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. *Parasitol Res* 98(2): 106-110.
- Rivera WL, Tachibana H, Silva-Tahat MR, Uemura H, & Kanbara H.** 1996. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res* 82(7): 585-589.
- Robert R, Mahaza C, Bernard C, Buffard C, & Senet JM.** 1990. Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol.* 28(6): 1422-1424.
- Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA, Jr., & Haque R.** 2005. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J.Clin.Microbiol.* 43(5): 2168-2172.
- Ruiz dG, Serra T, Leyes M, Delibes C, Salva F, & Perez JL.** 2004. Absceso hepático amebiano: observaciones sobre siete pacientes. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin* 22(9): 526-528.
- Sachez-Pobre P, Saenz-Lopez S, Salto E, Sanjuan R, Ibero C, Masedo A, & Solis Herruzo JA.** 2004. Absceso hepático amebiano sobreinfectado sin antecedentes epidemiológicos. *Rev Esp Enferm.Dig.* 96(11): 796-800.
- Sanchez-Guillen MC, Velazquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Perez-Fuentes R, Martinez-Munguia J, & Talamas-Rohana P.** 2000. Seroprevalence of anti-*entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assays in blood donors from Puebla, Mexico. *Arch.Med Res* 31(4 Suppl): S53-S54.
- Sanchez-Guillen MC, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Arguelles A, Ackers J, Shire A, & Talamas-Rohana P.** 2002. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 66(6): 731-737.
- Sanger F, Nicklen S, & Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* 74(12): 5463-5467.
- Sargeant PG.** 1987. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. *Parasitol Today* 3(2): 40-43.
- Sargeant PG, Williams JE, & Grene JD.** 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 72(5): 519-521.

**Shamsuzzaman SM, Haque R, Hasin SK, & Hashiguchi Y.** 2000. Evaluation of indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. *J Parasitol* 86(3): 611-615.

**Sharp SE, Suarez CA, Duran Y, & Poppiti RJ.** 2001. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. *J Clin Microbiol.* 39(1): 332-334.

**Shenai BR, Komalam BL, Arvind AS, Krishnaswamy PR, & Rao PV.** 1996. Recombinant antigen-based avidin-biotin microtiter enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of invasive amebiasis. *J Clin Microbiol.* 34(4): 828-833.

**Simonishvili S, Tsanava S, Sanadze K, Chlikadze R, Miskalishvili A, Lomkatsi N, Imnadze P, Petri WA, Jr., & Trapaidze N.** 2005. *Entamoeba histolytica*: the serine-rich gene polymorphism-based genetic variability of clinical isolates from Georgia. *Exp.Parasitol* 110(3): 313-317.

**Solaymani-Mohammadi S, Lam MM, Zunt JR, & Petri WA, Jr.** 2006a. *Entamoeba histolytica* encephalitis diagnosed by PCR of cerebrospinal fluid. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*

**Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, & Petri WA, Jr.** 2006b. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. *J.Clin.Microbiol.* 44(6): 2258-2261.

**Stanley SL, Jr.** 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361(9362): 1025-1034.

**Stanley SL, Jr., Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, & Li E.** 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* 87(13): 4976-4980.

**Stauffer W, Abd-Alla M, & Ravdin JI.** 2006. Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. *Arch.Med Res* 37(2): 266-269.

**Stauffer W & Ravdin JI.** 2003. *Entamoeba histolytica*: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16(5): 479-485.

**Strachan WD, Chiodini PL, Spice WM, Moody AH, & Ackers JP.** 1988. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1(8585): 561-563.

**Tachibana H, Kobayashi S, Okuzawa E, & Masuda G.** 1992. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. *Int J Parasitol* 22(8): 1193-1196.

**Tachibana H, Kobayashi S, Takekoshi M, & Ihara S.** 1991. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *J Infect.Dis* 164(4): 825-826.

**Tannich E & Burchard GD.** 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol.* 29(2): 250-255.

**Tanyuksel M & Petri WA.** 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 16(4): 713-+.

**Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Moller L, van Lieshout L, & Verweij JJ.** 2007. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol. Infect.* 13(10): 1001-1007.

**Thompson JE, Jr., Freischlag J, & Thomas DS.** 1983. Amebic liver abscess in a homosexual man. *Sex Transm. Dis.* 10(3): 153-155.

**Tovar J, Fischer A, & Clark CG.** 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 32(5): 1013-1021.

**Trissl D, Martinez-Palomo A, de la TM, de la HR, & Perez dS.** 1978. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp. Med* 148(5): 1137-1143.

**Troll H, Marti H, & Weiss N.** 1997. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol.* 35(7): 1701-1705.

**van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Peek R, Wetsteyn JC, van Genderen PJ, Vervoort T, & van Gool T.** 2005. Use of rapid dipstick and latex agglutination tests and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amebic liver abscess, amebic Colitis, and *Entamoeba histolytica* Cyst Passage. *J Clin Microbiol.* 43(9): 4801-4806.

**Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, & Polderman AM.** 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42(3): 1220-1223.

**Verweij JJ, Oostvogel F, Brienen EA, Nang-Beifubah A, Ziem J, & Polderman AM.** 2003. Short communication: Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. *Trop. Med. Int. Health* 8(12): 1153-1156.

**Verweij JJ, van Lieshout L, Blotkamp C, Brienen EA, van Duivenvoorden S, van Esbroeck M, & Polderman AM.** 2000. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* using PCR-SHELA and comparison of antibody response. *Arch. Med. Res.* 31(4 Suppl): S44-S46.

**Visser LG, Verweij JJ, van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, & Polderman AM.** 2006. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol.* 296(6): 397-403.

**Vreden SGS, Visser LG, Verweij JJ, Blotkamp J, Stuiver PC, Aguirre A, & Polderman AM.** 2000. Outbreak of amebiasis in a family in The Netherlands. *Clinical Infectious Diseases* 31(4): 1101-1104.

**Walderich B, Weber A, & Knobloch J.** 1997. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic areas. *Am J Trop Med Hyg.* 57(1): 70-74.

**Walsh JA.** 1986. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis - Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Reviews of Infectious Diseases* 8(2): 228-238.

**Weinke T, Friedrich-Janicke B, Hopp P, & Janitschke K.** 1990. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *J Infect.Dis* 161(5): 1029-1031.

**Zaki M & Clark CG.** 2001. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 39(3): 897-905.

**Zaki M, Meelu P, Sun W, & Clark CG.** 2002. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol.* 40(4): 1271-1276.

**Zaki M, Reddy SG, Jackson TF, Ravdin JI, & Clark CG.** 2003a. Genotyping of *Entamoeba* species in South Africa: diversity, stability, and transmission patterns within families. *J.Infect.Dis.* 187(12): 1860-1869.

**Zaki M, Verweij JJ, & Clark CG.** 2003b. *Entamoeba histolytica*: direct PCR-based typing of strains using faecal DNA. *Exp.Parasitol* 104(1-2): 77-80.

**Zaman S, Khoo J, Ng SW, Ahmed R, Khan MA, Hussain R, & Zaman V.** 2000. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 86(9): 724-728.

**Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng I, & Mirelman D.** 1999. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 37(9): 3034-3036.

**Zindrou S, Orozco E, Linder E, Tellez A, & Bjorkman A.** 2001. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Trop* 78(2): 117-125.