



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *Entamoeba* EN
MUESTRAS FECALES PROVENIENTES DE PACIENTES DEL ANEXO
PEDIÁTRICO DEL “HOSPITAL LUIS RAZETTI” DE BARCELONA, ESTADO
ANZOÁTEGUI Y SU RELACIÓN CON SÍNTOMAS CLÍNICOS
(Modalidad: Tesis de Grado)

Beatriz Ahmar Bachkanji

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2011

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *Entamoeba* EN
MUESTRAS FECALES PROVENIENTES DE PACIENTES DEL ANEXO
PEDIÁTRICO DEL “HOSPITAL LUIS RAZETTI” DE BARCELONA, ESTADO
ANZOÁTEGUI Y SU RELACIÓN CON SÍNTOMAS CLÍNICOS

APROBADO POR:

Profa. Hectorina Rodulfo
Asesora

Prof. Marcos De Donato
Coasesor

Profa. Del Valle Guilarte
Jurado Principal

Profa. Leonor Mora Vargas
Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	12
Población de estudio	12
Procesamiento de las muestras.....	13
Extracción de ADN.....	13
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36
ANEXOS	47
HOJA DE METADATOS	52

DEDICATORIA

A:

Dios Todopoderoso y mi virgencita del Valle.

Mi mami, que a pesar de la distancia siempre me apoyo y me dio los mejores consejos para seguir adelante. Te quiero mucho mamá.

Mi papi, por su amor y paciencia, por estar siempre conmigo apoyándome en todo momento. Eres mi mejor ejemplo. Te adoro papá.

Mis hermanos, por apoyarme y ayudarme en todo. Los quiero Yuli, Naim, Gladis y Joseph.

Carlos Cesar, por apoyarme siempre y por estar conmigo ayudándome en todo momento. Te quiero mucho mi niño.

Mi mejor amiga Exilis del Valle, por su atención y apoyo. Te quiero mucho mi amiga linda.

AGRADECIMIENTO

A:

Mi asesora Profa. Hectorina Rodulfo, que con sus conocimientos me ayudo en la realización de la tesis. Te quiero mucho profe, le tengo un gran cariño, gracias por todo y también por todo lo que me ha enseñado.

Mi coasesor Prof. Marcos De Donato, por su apoyo y ayuda profesional.

Mis compañeras: en especial a Exilis, además a todos lo que laboran en el laboratorio de genética molecular, por su apoyo y compañía en el transcurso de mi tesis.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos de los genes similares al ARNr 16S para el género <i>Entamoeba</i> y las especies <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> y <i>E. moshkovskii</i>	15
Tabla 2. Frecuencia de los signos y síntomas presentes en los niños infectados con <i>E. histolytica</i> asociados a otros protozoarios y helmintos intestinales, provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.....	18
Tabla 3. Resultados de microscopia y PCR de muestras fecales provenientes de niños del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.....	22
Tabla 4. Comparación del diagnóstico coproparasitológico, PCR y sintomatología en los niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.....	23
Tabla 5. Características macroscópicas de las materias fecales positivas por PCR en los niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.....	24
Tabla 6. Resumen del análisis estadístico de las características macroscópicas de la materia fecal, edad, sexo y sintomatología gastrointestinal, con respecto a las especies identificadas por PCR en las muestras de heces de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de infecciones por <i>E. histolytica</i> y otros protozoarios y helmintos intestinales diagnosticados por estudio coproparasitológico de la materia fecal en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.	17
Figura 2. ADN genómico de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui. Pozos 1-22 muestras evaluadas.	19
Figura 3. Presencia de <i>Entamoeba</i> por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen). C+: control positivo de <i>E. histolytica</i> 898 pb. C-: control negativo. Pozos 1-15 muestras evaluadas.	20
Figura 4. Presencia de <i>E. histolytica</i> por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen).C+: control positivo cepa NER de <i>E. histolytica</i> 439 pb. Pozos 1-74 muestras fecales evaluadas. C-: control negativo.	21
Figura 5. Presencia de <i>E. dispar</i> por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen). C+: control positivo cepa UDO de <i>E. dispar</i> 174 pb. Pozos 1-74 muestras fecales evaluadas. C-: control negativo.	21

RESUMEN

En esta investigación se planteó detectar por nested PCR las especies de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* en muestras fecales provenientes de pacientes del Anexo Pediátrico del Hospital “Dr. Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos. Para ello, de un total de 1 141 muestras de heces analizadas en dicho Laboratorio durante enero-agosto 2009, se muestrearon 150 heces de niños de 0-10 años y ambos sexos, diagnosticados coproparasitológicamente positivos a *E. histolytica*. Adicionalmente se obtuvo información de las características físicas de las muestras, signos y síntomas al momento del muestreo y el reporte de todos los helmintos y protozoarios intestinales identificados microscópicamente en cada una de las muestras evaluadas. Estas fueron colocadas en amortiguador fosfato salino (PBS) hasta su posterior procesamiento. A todas las 150 muestras se les realizó extracción de ADN genómico empleando el kit de extracción de ADN Wizard Genomic® de Promega y se aplicó la nested PCR amplificando la secuencia de ARNr 16S para detectar el género *Entamoeba* (898 pb) e identificar las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* con fragmentos de 439 pb, 174 pb y 553 pb, respectivamente. La asociación de las variables edad, sexo, sintomatología y características macroscópicas de las heces, con respecto a las especies de *Entamoeba* identificadas, fueron asociadas a través de la prueba Chi-cuadrado, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11,5. Los resultados demostraron una frecuencia de diagnóstico de *E. histolytica* del 13,15% en el centro asistencial evaluado (150/1 141), de las heces positivas a *E. histolytica* el 79,30% de las mismas presentó esta especie como único patógeno, 19,30% de los casos de *E. histolytica* estaban coinfectados con otros protozoarios como *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili* y el 1,40% estuvo acompañada con helmintos intestinales como *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana*. Sin embargo, cuando estas muestras positivas se analizaron por nested PCR se demostró que sólo el 28,00% (42/150) de las mismas presentaron infecciones por *Entamoeba*, evidenciándose elevado sobrediagnóstico de *E. histolytica* (72,00%) en la población infantil evaluada. Además, el método molecular permitió diferenciar 29 infecciones por *E. histolytica* (19,30%), 6 (4,00%) por *E. dispar*, y 7 (4,70%) infecciones mixtas *E. histolytica*/*E. dispar*. No se observó amplificación de la especie *E. moshkovskii* en las muestras evaluadas. Por otro lado, según los signos y síntomas de los niños evaluados, la diarrea fue el más común de estas infecciones, seguido de dolor abdominal y fiebre; sin embargo, tanto *E. histolytica* como *E. dispar* fueron identificadas en los mismos grupos de individuos sintomáticos. De igual forma, las características macroscópicas de las heces no mostró un patrón característico de especies y a pesar de que la presencia de sangre demostró una asociación estadísticamente significativa con *E. histolytica*, en algunas infecciones por *E. dispar* también se reportó presencia de sangre en la materia fecal. En conclusión, la técnica de PCR evidenció ser más útil en la detección e identificación de las especies del género *Entamoeba*, demostrando que el diagnóstico coproparasitológico genera sobrediagnóstico de la especie patógena *E. histolytica*, la cual está asociada estadísticamente a la presencia de sangre en las heces.

Palabra y o Frases Claves: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, PCR

INTRODUCCIÓN

El género *Entamoeba* comprende un conjunto de amibas pertenecientes al phylum Sarcomastigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, familia Entamoebidae (Chester et al., 1992). Un gran número de especies se encuentran en el intestino humano: *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba hartmanni* y *Entamoeba histolytica*, estando esta última implicada en cuadros patológicos (Clark y Diamond, 1991a; García y Bruckner, 1997).

La amibiasis fue reconocida por primera vez, como una enfermedad mortal por Hipócrates (377-460 AC) quien describió pacientes con fiebre y disentería. Más tarde, el antiguo testamento de Huang (140-187 AC) un clásico de medicina interna, hace también referencia a la disentería (Tanyuksel y Petri, 2003). Sin embargo, los hitos en el estudio de *E. histolytica*, fueron los realizados por Lösch, en 1875, describiendo por primera vez en detalle la amibiasis intestinal ocasionada por *E. histolytica*; sin embargo, ese nombre fue colocado por Schaudinn en 1903 (Saklatvala, 1993). Posteriormente, Brumpt en 1925 formula la teoría sobre la diferencia entre las infecciones amibianas asintomáticas y la enfermedad amibiana, donde podría estar relacionada con la existencia de dos especies distintas, pero morfológicamente idénticas: *E. histolytica*, capaz de causar la enfermedad invasiva, y *E. dispar*, que nunca causa enfermedad. Esta teoría fue descartada por un tiempo, hasta que las evidencias que apoyaban la hipótesis de Brumpt comenzaron a acumularse. En 1993, 68 años después del descubrimiento original de *E. dispar*, se aceptó formalmente que *E. histolytica* y *E. dispar* son especies diferentes, estrechamente relacionadas, con base en análisis genéticos, inmunológicos y bioquímicos (Diamond y Clark, 1993; Stauffer y Ravdin, 2003; Tanyuksel y Petri, 2003).

A pesar de que *E. dispar* fue considerada especie comensal, se han descrito síntomas intestinales en pacientes infectados por esta especie (Jetter et al., 1997; Parija y Khairnar, 2007). Además, se ha demostrado que en animales, *E. dispar* causa lesiones focales variadas en intestino (Chadee et al., 1985; Vohra et al., 1989; Espinosa-Cantellano et al., 1997), destruyendo monocapas de células epiteliales in vitro (Espinosa-Cantellano et al., 1998). También hay evidencias de que una infección por *E. dispar*, puede ocasionar cambios patológicos en el humano (McMillan et al., 1984). Sin embargo, no existen estudios de casos controlados dirigidos a conocer y evaluar el verdadero potencial patógeno de este organismo.

Con respecto a *E. moshkovskii*, es otra de las especies indistinguibles morfológicamente de *E. histolytica* y *E. dispar*. Fue descrita en Moscú en 1941 (Tshalaia, 1941) y después reportada en diferentes países (Scaglia et al., 1983; Clark y Diamond, 1991b). *E. moshkovskii* fue inicialmente considerada como una cepa medioambiental de vida libre; sin embargo, en 1961 una cepa *E. histolytica*-like fue aislada en Laredo, en un paciente con diarrea (Dreyer, 1961); esta cepa compartía características con *E. moshkovskii* como: crecimiento a temperatura ambiente, osmotolerante y resistencia a emetina, dichas características la diferencian de *E. histolytica* y *E. dispar*.

Posteriormente se confirmó, por estudios moleculares, que la cepa de *E. histolytica* Laredo era una cepa de *E. moshkovskii*. Recientes estudios han demostrado la presencia de esta última en humanos, aunque no se ha evidenciado asociación con enfermedad clínica (Clark y Diamond, 1991b; Haque et al., 1998a; Ali et al., 2003; Fotedar et al., 2007; Parija y Khairnar, 2007; Tanyuksel et al., 2007). Estudios en Bangladesh e India, reportan a *E. moshkovskii* como potencial enteropatógeno en pacientes con síntomas gastrointestinales y/o disentería (Haque et al., 1998a; Parija y Khairnar, 2007).

Aunque diversos estudios destacan la presencia de *E. dispar* y *E. moshkovskii* en pacientes con síntomas gastrointestinales (Haque et al., 1998a; Visser et al., 2006; Fotedar et al., 2007; Parija y Khairnar, 2007; Tanyuksel et al., 2007), no existen, hasta el momento, evidencias definitivas que demuestren que estas dos especies causan sintomatología gastrointestinal en el hospedero (Sargeant et al., 1978; Diamond y Clark, 1993; Ortner et al., 1997).

La especie *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis intestinal y es considerada mundialmente como uno de los parásitos principales que causa mortalidad en humanos (WHO, 1997a; Haque et al., 2003; Haque y Petri, 2006). Sin embargo, aún en la mayoría de los pacientes infectados con *E. histolytica* el organismo no es capaz de invadir la mucosa del colon y desarrollar la enfermedad invasiva, aunque el potencial para desarrollar esta última existe en cada individuo, y en este sentido, los factores que previenen o favorecen la invasión de esta amiba intestinal no están bien entendidos (Variyam, 1993). Adicionalmente, se conoce que el genotipo del parásito juega un papel determinante en el resultado de la infección por *E. histolytica* (Ali et al., 2007). Por lo tanto, una de las prioridades actuales en la era postgenómica es comprender los factores genéticos que determinan el resultado de una infección por *E. histolytica* (Ali et al., 2008).

Se conoce que las infecciones por el género *Entamoeba* tienen un ciclo biológico sencillo, que se inicia por ingestión de quistes tetranucleados en agua o alimentos contaminados, estos quistes infectantes resisten el pH ácido del estómago del hospedero, y viajan a través del lumen del intestino delgado (ileón terminal), donde ocurre el desenquistamiento por la acción del medio alcalino y enzimas digestivas presentes en el mismo, emergiendo del quiste una amiba multinucleada que da lugar a cuatro pequeñas amibas que originan a su vez ocho trofozoítos similares a los precedentes. Estas formas vegetativas y móviles llegan al intestino grueso donde se alimentan de bacterias, detritus y otras células en contacto con su superficie,

aumentando de tamaño y alcanzando las dimensiones definitivas de los trofozoítos maduros característicos de cada especie, los cuales continúan dividiéndose por división binaria. En el caso de *E. histolytica*, en ciertas circunstancias, puede desencadenar la patogénesis de amibiasis invasiva de la mucosa intestinal adhiriéndose e invadiendo las células epiteliales intestinales, además pueden migrar hacia otros órganos ocasionando amibiasis extraintestinal, por los diferentes mecanismos patogénicos, como formación de poros en la membrana, producción de proteasas y eritrofagocitosis, entre otras. Los trofozoítos del género *Entamoeba* son fácilmente destruidos en el ambiente exterior, degenerándose en minutos, y en condiciones adversas, eliminan sus vacuolas alimenticias, condensándose en una masa esférica que viene a ser el prequiste. Posteriormente, esta célula se cubre de una pared protectora y se convierte en un quiste inmaduro que sólo posee un núcleo. Dos divisiones nucleares sucesivas originan finalmente el quiste tetranucleado que es eliminado en las heces, continuando así el ciclo biológico de estos parásitos (Pumarola et al., 1991; Variyam, 1993; Tanyusel y Petri, 2003; Rashidul et al., 2005).

Una fuente de infección relevante la constituyen aquellos casos de portadores asintomáticos a la enfermedad que en ciertos períodos presentan algún síntoma diarreico y eliminan quistes los cuales son de gran importancia epidemiológica porque se comportan como diseminadores de la infección. La transmisión de la enfermedad es facilitada por diversos factores como: la mala higiene personal, la falta de agua potable e inadecuada manipulación de alimentos. Esta infección afecta, en su mayoría, las poblaciones de bajos recursos económicos y de extrema pobreza (Valdez et al., 1999; Jackson, 2000). La mala disposición de excretas y basura, el hacinamiento y las relaciones homosexuales promiscuas también son importantes mecanismos de transmisión, así como los vectores mecánicos, tales como moscas y cucarachas, entre otros (Kimura et al., 1997). Esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños mayores de 3 años y adultos jóvenes, donde el saneamiento es deficiente (Haque et al., 1999).

La tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas en el mundo, ha disminuido debido principalmente a la aplicación de mejores terapias e intervenciones que promueven las condiciones sanitarias y educativas en los habitantes de las poblaciones afectadas, para que éstos se animen a participar en actividades de atención primaria de salud (Bern et al., 1992; WHO, 1995). No obstante, las enfermedades diarreicas agudas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo (Bern et al., 1992; Haque et al., 2000). En este sentido, los estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas son el paso inicial hacia la implementación de intervenciones adecuadas para controlar la enfermedad, por que las características y patrones de aislamiento de los agentes etiológicos de la enfermedad varían de un lugar a otro, dependiendo de los elementos meteorológicos, geográficos y socioeconómicos (Abrego et al., 1991; Chomlasak et al., 1998).

Con respecto a la epidemiología de las infecciones humanas por *E. histolytica*, se conoce que en países en desarrollo, esta infección es común en niños, y en países endémicos está asociada a diarreas o disenterías (Butler et al., 1988). Sin embargo, las características clínicas de la amibiasis por *E. histolytica* se extienden desde colonización asintomática hasta disentería amibiana y amibiasis extraintestinal invasiva, manifestándose esta última, comúnmente, bajo la forma de abscesos en el hígado (Boonyapisit et al., 1993; Shandera et al., 1998). Al respecto, se reporta que aproximadamente entre 34 y 50 millones de personas tienen la enfermedad invasiva, originando de 34 000 y 100 000 muertes por año (WHO, 1997b). Aunque este parásito tiene distribución mundial, las prevalencias superiores al 10,00% han sido reportadas en varios países en desarrollo (Stanley, 2003). A pesar de la disponibilidad de terapias efectivas contra *E. histolytica*, la morbilidad y mortalidad de la infección ha persistido, sugiriendo esto que las medidas para eliminar o limitar la enfermedad son ineficaces y, como al parecer el humano es el único hospedador, un programa de

control apropiado debería erradicar la infección (Blessmann et al., 2002; Blessmann et al., 2006).

El diagnóstico de la infección por *E. histolytica* ha dependido del estudio de los síntomas clínicos del paciente así como del examen microscópico de muestras fecales seriadas, en el cual se observa el tamaño de los trofozoítos (10-60 μm de diámetro) y quistes (10-15 μm de diámetro) característicos del parásito en las muestras de heces, número de núcleos en el quiste maduro, estructura nuclear, entre otros (Anexo I).

A pesar de que el examen directo es rápido y sencillo, tiene una sensibilidad limitada y requiere de un observador experimentado que interprete acertadamente la diferencia limitada entre la especie patógena y las no patógenas; representando esto graves causas de errores para el diagnóstico de esta infección. Se señala que el examen directo no es suficiente para el diagnóstico de *E. histolytica* por lo que, debe complementarse con técnicas de tinción como la coloración permanente tricrómica, que se recomienda como técnica auxiliar al método directo, ya que permite una mejor visualización de los elementos intracelulares de esta especie (Yau et al., 2001; Tanyusel y Petri, 2003). Sin embargo, Haque et al. (2003) mencionan que la coloración tricrómica y la hematoxilina férrica son técnicas insensibles para la detección de *E. histolytica*, además de no permitir diferenciar entre esta especie patógena de las no patógenas que son morfológicamente idénticas.

En este orden de ideas, la presencia de falsos negativos con *E. histolytica*, radica en el problema que existe en identificarla, ya que en muchas observaciones microscópicas es subdiagnosticada por pasar desapercibida, debido a la demora (degenerándose la fase móvil del trofozoíto), además de otras causas como: poco tiempo requerido en el análisis de la muestra fecal recién emitida, deficiente preparación teórica-práctica de quienes realizan el diagnóstico de la amibiasis y falta de métodos complementarios que ayuden a la mejor visualización de los trofozoítos

hematófagos, entre otros (Temesvari et al., 1999). Los falsos positivos también se producen usando la microscopia como método de diagnóstico, debido a la confusión para identificar y diferenciar la amiba patógena de macrófagos y de las especies no patógenas (Krogstad et al., 1978; Stracham et al., 1988; González-Ruiz et al., 1994; Haque et al., 1997). Estas dificultades en el diagnóstico de *E. histolytica* con respecto a las otras especies del género *Entamoeba*, es lo que en muchos casos origina que las prevalencias de esta infecciones varíen enormemente de un lugar a otro (Gathiram y Jackson, 1987).

Por ello, desde 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reglamentó reportar el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, en presencia de quistes y trofozoítos no hematófagos; además, recomendó identificar y diferenciar la especie patógena *E. histolytica* de las otras especies no patógenas del género, debido a que estas últimas no requieren tratamiento (WHO, 1997a). No obstante, la aplicación de tratamientos erróneos está motivado en parte a que el diagnóstico de infecciones intestinales por *E. histolytica* se basan principalmente en el estudio microscópico de la materia fecal, metodología que tiene una sensibilidad del 60,00% cuando se realiza bajo condiciones óptimas (Krogstad et al., 1978; Haque et al., 1995). Además de la desventaja de este tipo de diagnóstico para diferenciar las especies de *Entamoeba*, debido a que los quistes y trofozoítos de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* son idénticos (Anexo II), excepto en los casos de enfermedad invasiva por *E. histolytica*, donde se observan los trofozoítos de la amiba con glóbulos rojos ingeridos (Gonzalez-Ruiz et al., 1994).

Por su parte, los cultivos de las heces, seguido de un análisis de isoenzimas, permiten diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar*, pero se requiere de una o varias semanas para obtener resultados e instalaciones especiales en los Laboratorios, lo cual es impráctico para ser empleado como rutina en el diagnóstico de la amibiasis intestinal (Huston et al., 1999). Existen diversas técnicas para la detección e

identificación específica de *E. histolytica*, como por ejemplo, la detección de coproantígenos por la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA). Además, varias pruebas de diagnóstico molecular han sido desarrolladas para la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito, incluyendo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, pruebas que han sido efectivas para detección y diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras clínicas.

Más recientemente, Alla et al. (2002) y Ali et al. (2005) describieron dos protocolos rápidos y muy sensibles de PCR en tiempo real para detectar y diferenciar *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras fecales. La eficacia comparativa de distintos métodos de diagnóstico especies-específicos ha sido el tema de varios artículos (Mirelman et al., 1997; Haque et al., 1998b; Chiodini et al., 2004; Butcher et al., 2008). En general, los autores concluyeron que la detección de antígeno y PCR (PCR estándar, PCR-SHELA y PCR en tiempo real) pueden ser realizados adecuadamente, pero la elección del método depende del presupuesto y del período de estudio, no obstante estas pruebas han sido efectivas para detección y diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras clínicas. Esto ha conducido a una nueva reevaluación en la epidemiología de la amibiasis en términos de prevalencia y morbilidad, en particular en áreas geográficas con alta endemicidad (Beltramino et al., 1989; Takeuchi et al., 1989; Ohnishi y Murata, 1997; Ali et al., 2003).

Al respecto, en Bangladesh, Ali et al. (2003) empleando la PCR para detectar *E. moshkovskii* directamente en las heces de 109 niños en edad preescolar, reportan 17 muestras positivas para *E. histolytica* (15,60%); 39 fueron identificadas como *E. dispar* (35,80%). Además, encontraron 23 (21,10%) positivas para la infección por *E. moshkovskii*, y 17 (73,90%) presentaron infecciones mixtas *E. histolytica*/*E. dispar*. Este estudio demuestra que, la alta asociación de *E. histolytica*, *E. dispar* y

E. moshkovskii puede haber enmascarado la identificación de esta última especie en estudios previos.

Por otro lado, en India, Parija y Khaimar (2007), al estudiar 746 muestras de heces con quistes y trofozoítos de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, utilizando PCR para amplificar la subunidad pequeña del ARNr, reveló una mayor prevalencia de *E. dispar* (8,80%) y *E. moshkovskii* (2,20%) en comparación con *E. histolytica* (1,70%). Sólo el 19,00% de 68 muestras de heces, que presentaron morfología semejante a *E. histolytica* mediante microscopia, eran en realidad esta especie, lo que implica que el 81,00% de las infecciones sospechosas fueron mal diagnosticadas, por lo que los pacientes fueron tratados innecesariamente con medicamentos antiamibianos.

Del mismo modo, Fotedar et al. (2007), en Sydney, Australia detectando por microscopia y PCR estas tres especies de Entamoeba, encontraron que de un total de 123 muestras solo 5 fueron infecciones por *E. histolytica*, mientras que 63 (70,80%) y 55 (61,80%) muestras estaban infectadas por *E. dispar* y *E. moshkovskii*, respectivamente.

Con respecto al diagnóstico de estas especies en Venezuela, Chacín et al. (1990a) reportaron porcentajes de la infección por el complejo *E. histolytica*/*E. dispar* entre 6,80 a 42,00%, distribuidos de 1,80 a 29,50% para las áreas urbanas y hasta 20,00% en rurales. Además, este complejo presenta prevalencias importantes en diferentes áreas de estudio del país (Arenas-Pinto et al., 2003; Miller et al., 2003; Díaz et al., 2006). Entre los años 2007 y 2010, se reportaron 6 872 282 casos de diarreas, principalmente en niños, de éstos 574 225 representan casos de amibiasis, siendo el estado Zulia el que representa el mayor número de casos en el país y en la región oriental los estados Anzoátegui y Sucre son los más afectados (Boletín Epidemiológico del MPPS 2007-2010).

Con respecto a la identificación de *E. histolytica*/*E. dispar* en el estado Sucre, Michelli (2004) no detectó infecciones por estas especies en las poblaciones de Caituco y Llanada de Cangua. Sin embargo, Mora et al. (2005), en pacientes con sintomatología gastrointestinal de Cumaná, registra una prevalencia del complejo de 16,00% usando microscopia convencional, ubicándose el mayor número de infectados entre 10-19 años. Posteriormente, Mora (2006) en la misma ciudad, evaluó 428 pacientes con diarrea por PCR, encontrando 23 infecciones por *E. histolytica*, 15 con *E. dispar* y 4 infecciones mixtas, demostrando que ambas especies circulan en esta población.

Por su parte, Rivero et al. (2009) en Maracaibo, estado Zulia, determinaron la prevalencia de infecciones por *E. histolytica* y *E. dispar* en 204 muestras de heces mediante el examen microscópico directo con SSF (0,85%) y lugol, y la técnica de concentración formol-éter, obtuvieron como resultado 42 personas (20,58%) presentando el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*. Mientras que por PCR mostraron 47 casos positivos para estas amibas: 22 *E. histolytica* (10,78%), 16 *E. dispar* (7,84%), y 9 (4,41%) infecciones mixtas. Resaltando que la frecuencia de *E. histolytica* encontrada (31/204) demuestra el carácter endémico de la infección por ameba en esta comunidad.

En Venezuela, debido a la elevada prevalencia de casos de diarreas en diferentes estados del país, y a que de estos casos, un número importante de infecciones por el género *Entamoeba* son reportadas en el estado Anzoátegui, se hace necesario la aplicación de métodos más apropiados, sensibles y específicos que permitan la detección y diferenciación de las especies de este género, que faciliten la aplicación de tratamientos oportunos y precisos en los casos de las infecciones por *E. histolytica*, por ser esta la única especie reportada como patógena del género. En este sentido, los métodos moleculares como la PCR ha demostrado tener mayor sensibilidad de detección, cuando son comparados con otras técnicas de diagnóstico

de amibiasis, contribuyendo no sólo al diagnóstico de la especie de *Entamoeba* implicada en un cuadro clínico, sino también a la evaluación de la población asintomática infectada, que tiene gran valor epidemiológico por ser un reservorio para la infección de las especies del género *Entamoeba* y contribuir a la diseminación de las mismas. Además, la PCR contribuye al conocimiento epidemiológico del número real de casos de infecciones por estas amibas y distribución de las mismas en la población, lo que conduce a la aplicación de planes terapéuticos y preventivos más acertados. En este sentido, esta investigación pretendió detectar por nested PCR las especies de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras fecales provenientes de pacientes del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos, permitiendo conocer sobre las especies de este género y su distribución en esta área de estudio, además de ofrecer un método alternativo para la confirmación del diagnóstico de amibiasis intestinal, evitándose el empleo innecesario de tratamientos o sobredosis que conduzcan a la multidrogoresistencia en los pacientes con esta infección.

METODOLOGÍA

Población de estudio

De todas las muestras fecales analizadas en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui durante el periodo enero-agosto 2009, se muestrearon 150 de las mismas para esta investigación, las cuales eran provenientes de niños de 0-10 años y ambos sexos, diagnosticadas en este centro asistencial coproparasitológicamente positivas a *Entamoeba histolytica*, empleando preparaciones húmedas con solución salina fisiológica al 0,85% y solución de lugol. Adicionalmente se obtuvo la información relacionada con cada una de las muestras a evaluar, como características físicas de la muestra: aspecto, consistencia, color, olor, pH, presencia o ausencia de moco, sangre y/o vermes adultos. Por otro lado, se recopilaron los datos referentes a los signos y síntomas de los niños al momento de la recolección de la muestra (fiebre, diarrea, dolor abdominal, entre otros) y se anotó el reporte de todos los helmintos y protozoarios intestinales identificados microscópicamente en cada una de las muestras (Anexo III).

A cada uno de los representantes legales de los niños que participaron en este estudio, se les solicitó el consentimiento previa información sobre el objetivo del mismo y su participación en la investigación, de acuerdo a los lineamientos de Idänpään-Heikkilä (2001) para los trabajos de investigación en humanos (Anexo IV). Una vez que el representante autorizó la participación en esta investigación y que las muestras fecales fueron procesadas coproparasitológicamente por los bioanalistas del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, se procedió a la colecta de las mismas, colocando aproximadamente 1gr de la materia fecal en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml que contenían 500 µl de solución amortiguadora fosfato salino (PBS) 1X (cloruro de sodio (NaCl) 137 mmol/l; cloruro de potasio (KCl) 2,7

mmol/l; disodio hidrógeno ortofosfato (Na_2HPO_4) 10 mmol/l; fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 2 mmol/l) manteniendo las mismas en cadena de frío durante su traslado al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas Dra. “Susan Tai” de la Universidad de Oriente, (IIBCA-UDO) Núcleo de Sucre, donde se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesamiento para el análisis molecular de las mismas.

Procesamiento de las muestras

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se le realizó a todas las 150 muestras fecales evaluadas, utilizando el kit de extracción de ADN Wizard Genomic® de Promega.

Se procedió a realizar el protocolo sugerido por el fabricante: se tomaron 200 μl de las muestras fecales conservadas en PBS y se colocaron en otro tubo Eppendorf, se centrifugaron a 14 000 g durante 3 min a 18°C y se descartó el sobrenadante. Se colocó 400 μl de solución lisante de núcleo y se procedió a mezclar por pipeteo el sedimento. La cubierta de los quistes que pudieran estar presentes fue fracturada por sonicación, empleando un sonicador de alta intensidad (AutotoneUltrasonic) a mínima velocidad por 2 seg con tres repeticiones, manteniendo siempre la muestra en hielo. Luego se agregó 10 μl de proteinasa K y se incubó las muestras durante 2 horas a 65°C . Luego se dejó enfriar por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μl de solución precipitante de proteínas y posteriormente se centrifugó a 14 000 g durante 15 min a 4°C . Se removió cuidadosamente el sobrenadante con el ADN genómico y se trasladó a tubos Eppendorf de 1,5 ml estériles que contenían 500 μl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución por inversión y se colocó en hielo por 5 min. Se procedió a centrifugar a 14 000 g por 10 min a 4°C . Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el ADN extraído quedó en el fondo del tubo Eppendorf, formando un pequeño precipitado blanco. Posteriormente, se

agregaron 500 µl de etanol al 70,00% y se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 14 000 g por 5 min a 4oC. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado entre 20 y 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 50 µl de solución rehidratante, y el ADN se almacenó a -20oC, hasta su posterior uso para la PCR.

La calidad y cantidad de ADN genómico obtenido fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 2,00% (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo), en solución amortiguadora Tris-ácido bórico-ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) a 80 V por 30 minutos, y luego se visualizaron en un transluminador ultravioleta usando coloración con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica consiste en tres procesos: la desnaturalización del ADN doble cadena, hibridación de los cebadores a la hebra molde del ADN en un blanco específico y la extensión del cebador por síntesis del fragmento amplificado (Schnell y Mendoza, 1997). Esta metodología en su modalidad de nested PCR ha sido propuesta por el Centro Internacional para la Investigación de Enfermedades Diarreicas, de Dhaka, Bangladesh (por su siglas en ingles ICDDR, B), así como el Instituto Jawaharlal de Investigación y Educación Médica postgraduado (de sus siglas en inglés JIPMER) de Puducherry, India (WHO, 1997b; Ali et al., 2003; Parija y Khairmar, 2007) como método óptimo para la detección y diferenciación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, usando como blanco genómico la secuencia de genes similares al ARNr 16S.

En la amplificación por nested PCR o de doble ronda, se amplificó primero un fragmento específico del género *Entamoeba* y posteriormente se amplificó el fragmento específico para las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* (Tabla1). Para cada reacción de PCR se emplearon muestras controles positivas de *E. histolytica*, cepas: IULA: 0593:2 (NER), HK9 y MMM, donadas por el Instituto de

Inmunología de la Universidad de los Andes (ULA), Mérida, Venezuela; cepas de *E. dispar* UDO402 (Mora, 2006). Además, se utilizó un control negativo de reacción, que solo contenía 1 µl de agua.

Para la primera reacción de PCR, se utilizaron los oligonucleótidos E-1 y E-2 (Tabla 1), que amplifican un fragmento de 898 pb común para todas las especies de *Entamoeba*.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25,0 µl; con 2,5 µl de buffer para PCR 10X, 1,5 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) 25,0 mmol/l; 1,4 de la mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (5,0 mmol/l de cada uno); 0,3 µl de GoTaq polimerasa de Promega (5 UI/µl); 0,3 µl de cada oligonucleótido y 1,0 µl de ADN purificado (Parija y Khairnar, 2007).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos de los genes similares al ARNr 16S para el género *Entamoeba* y las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

Oligonucleótidos	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb)
Género <i>Entamoeba</i>	E-1 TAAGATGCACGAGAGCGAAA E-2 GTACAAAGGGCAGGGACGTA	898
<i>E. histolytica</i>	EH-1 AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG EH-2 AAGAGGTCTAACCGAAATTAG	439
<i>E. dispar</i>	ED-1 TCTAATTTTCGATTAGAACTCT ED-2 TCCCTACCTATTAGACATAGC	174
<i>E. moshkovskii</i>	Mos-1 GAAACCAAGAGTTTCACAAC Mos-2 CAATATAAGGCTTGGATGAT	553

Una alícuota de 1,0 µl del producto amplificado de la primera reacción de PCR fue utilizado como ADN molde para cada una de las tres reacciones especie-específicas separadas (*E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*), en las cuales se emplearon los pares de oligonucleótidos específicos de especie (Tabla 1). Todas las

muestras fueron corridas en un termociclador TECHNE (TC-512), utilizando el siguiente programa de amplificación: naturalización inicial de 96°C por 2 min, seguido de 30 ciclos con los siguientes pasos: Desnaturalización a 92°C por 1 min, apareamiento a 56°C por 1 min y extensión a 72°C por 1,5 min. Finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 7 min. La segunda amplificación se realizó de la misma manera a la descrita anteriormente, cambiando la temperatura de apareamiento por 48°C (Parija y Khairnar, 2007). Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2,00% (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo), en solución amortiguadora Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1X a 80 V por 45 min, y luego se visualizaron en un transluminador ultravioleta usando coloración con bromuro de etidio (0,5 µg/ml); usando un marcador de masa molecular de 100 pb de Axigen.

Análisis estadístico

La evaluación de los resultados obtenidos fueron expresados en tablas y figuras. La asociación de las variables edad, sexo, sintomatología y características macroscópicas de la materia fecal, con respecto a las especies de Entamoeba evaluadas en este estudio, fueron asociadas a través de la prueba Chi-cuadrado (χ^2) (Morales y Pino, 1995; Sokal y Rohlf, 1996), utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11,5. Para establecer la comparación del diagnóstico coproparasitológico, PCR y sintomatología en los niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, las muestras fueron agrupadas de acuerdo a los protozoarios y helmintos intestinales diagnosticados en las mismas, quedando organizadas de la siguiente forma:

Grupo A: E. histolytica

Grupo B: E. histolytica, G. duodenalis y B. hominis

Grupo C: E. histolytica, E. coli y C. mesnili

Grupo D: E. histolytica, T. trichiura e H. nana

RESULTADOS

De un total de 1 141 muestras fecales que fueron recibidas en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui, se evaluaron para esta investigación 150 muestras fecales de niños con edades comprendidas entre 0-10 años, de ambos sexos, las cuales fueron diagnosticadas en este centro asistencial como positivas a *Entamoeba histolytica* por análisis coproparasitológico convencional, empleando preparaciones húmedas con solución salina al 0,85% y solución de lugol. De estas, un 79,30% (119/150) se identificaron únicamente con formas quísticas y trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 1), en el 19,30% (29/150) además de los quistes y trofozoítos de *E. histolytica* se observaron formas evolutivas de otros protozoarios intestinales como *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili* y en el 1,40% (2/150) se evidenciaron quistes de *E. histolytica* con huevos de helmintos intestinales como *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana* (Figura 1).



Figura 1. Frecuencia de infecciones por *E. histolytica* y otros protozoarios y helmintos intestinales diagnosticados por estudio coproparasitológico de la materia fecal en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.

Estos resultados de la figura 1 demuestran mayor predominio de infecciones producidas por protozoarios intestinales en las muestras analizadas, en comparación con la baja frecuencia de helmintiasis diagnosticadas. Sin embargo, hay que resaltar que a estas muestras fecales no se les realizan métodos de concentración como parte del diagnóstico clínico, lo que posiblemente disminuye la frecuencia de helmintos y otros protozoarios intestinales en las muestras analizadas en el Laboratorio del Anexo Pediátrico “Dr. Rafael Tobías Guevara”.

Por otro lado, al asociar estas muestras con respecto a la información recolectada sobre la clínica presentada en cada uno de los niños evaluados para el momento de la toma de muestras, se encontró que el 98,70% (148/150) de las mismas presentaron diversos signos y síntomas, entre los cuales se puede mencionar: diarrea aguda 68,00% (102/150), síndrome febril 16,00% (24/150), dolor abdominal 12,70% (19/150), cuadro disentérico 2,00% (3/150) y el 1,30% (2/150) no presentó síntomas gastrointestinales (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de los signos y síntomas presentes en los niños infectados con *E. histolytica* asociados a otros protozoarios y helmintos intestinales, provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.

Impresión diagnóstica	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica,</i> <i>G. duodenalis</i> <i>B. hominis</i>	<i>E. histolytica,</i> <i>E. coli</i> y <i>C. mesnili</i>	<i>E. histolytica,</i> <i>T. trichiura</i> e <i>H. nana</i>	Total
Diarrea aguda	80	12	8	2	102
Fiebre	19	3	2	0	24
Dolor abdominal	16	1	2	0	19
Disentería	2	0	1	0	3
Asintomáticos	2	0	0	0	2
Total	119	16	13	2	150

Como se observa en la tabla 2 en 119 (79,30%) niños sintomáticos y asintomáticos se identificó *E. histolytica* como único parásito patógeno usando la

microscopia convencional como método de diagnóstico, mientras que solo en 12,00% de las muestras (18/150) se reportó ésta amiba en muestras fecales acompañada de otros protozoarios y helmintos intestinales patógenos al hombre y en 8,70% de las muestras (13/150) estuvo *E. histolytica* causando infecciones con protozoarios comensales como *E. coli* y *C. mesnili* (Tabla 2).

Independientemente del resultado coproparasitológico, todas las 150 muestras fecales evaluadas, fueron sometidas a extracción de ADN genómico directamente de las muestras, empleando el estuche comercial Wizard® Genomic de Promega. Esta técnica fue modificada, adicionando la sonicación de las muestras con solución lisante de núcleos y proteinasa K. Bajo esta modificación se logró mejorar significativamente la obtención de ADN genómico, esto se puede evidenciar en los pozos del 1 al 22 de la Figura 2, donde se representan algunas de las muestras evaluadas, observando las bandas características de alta masa molecular. Sin embargo, en algunas muestras el ADN genómico se presentó con varias bandas de menor masa (pozos 3, 15, 17 y 19), lo cual es posiblemente indicativo de la presencia de ácidos nucleicos de origen bacteriano específicamente ARNr de bacterias, esto evidentemente motivado a que se trabajó con la muestra fecal directamente y esta contiene flora bacteriana acompañante, células del hospedero, entre otros.

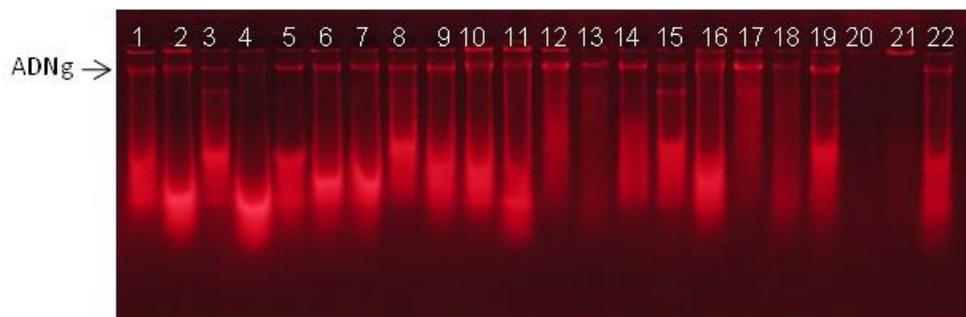


Figura 2. ADN genómico de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui. Pozos 1-22 muestras evaluadas.

El análisis por nested PCR de las 150 muestras diagnosticadas positivas a *E. histolytica* en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, se encontró que al amplificar la primera ronda correspondiente al género *Entamoeba* se observó el amplificado de 898 pb en el control positivo empleado (cepa NER de *E. histolytica*) en el pozo C+ (Figura 3), este mismo amplificado también fue observado en pocas de las 150 muestras fecales evaluadas, como se observa en los pozos (12 y 13) que representa 2 de las muestras fecales analizadas en este estudio (Figura 3), esto, posiblemente debido a la baja carga parasitaria de las especies de *Entamoeba*.

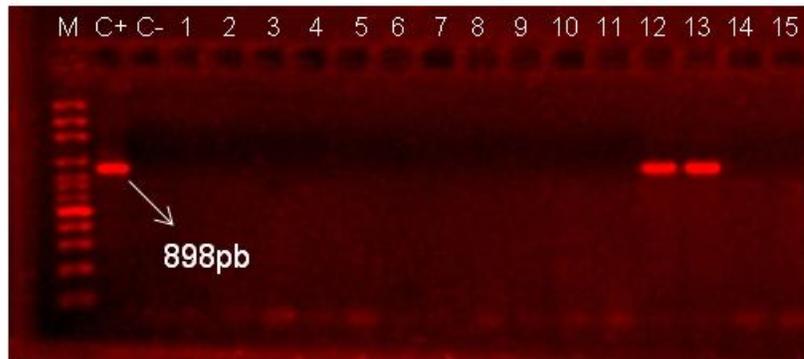


Figura 3. Presencia de *Entamoeba* por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen). C+: control positivo de *E. histolytica* 898 pb. C-: control negativo. Pozos 1-15 muestras evaluadas.

A pesar de ello, cuando se amplificaron todas las muestras para la segunda ronda de los fragmentos específicos de especies, se observó que tanto el control positivo a *E. histolytica* (C+: cepa NER) como el de *E. dispar* (cepa UDO) mostraron el fragmento característico de 439 pb (Figura4) y 174 pb (Figura 5). Así los resultados de la nested PCR permitieron detectar un 28,00% (42/150) de las muestras, con infecciones por especies de *Entamoeba*. De estas 42 muestras, a 29 (19,30%) se les identificó la especie patógena *E. histolytica* con un fragmento característico de 439 pb tal como se observa en las muestras corridas en los pozos 5,

34, 35,45 y 50 del gel de agarosa (Figura 4), 6 infecciones (4,00%) fueron por *E. dispar* con un fragmento específico de 174 pb observados en las muestras de los pozos 48, 60 y 74 de la Figura 5, y 7 infecciones mixtas (4,70%) por *E. histolytica/E. dispar* (*E.h/E.d*). No se observó amplificación de especies en la reacción para *E. moshkovskii* en las muestras evaluadas.

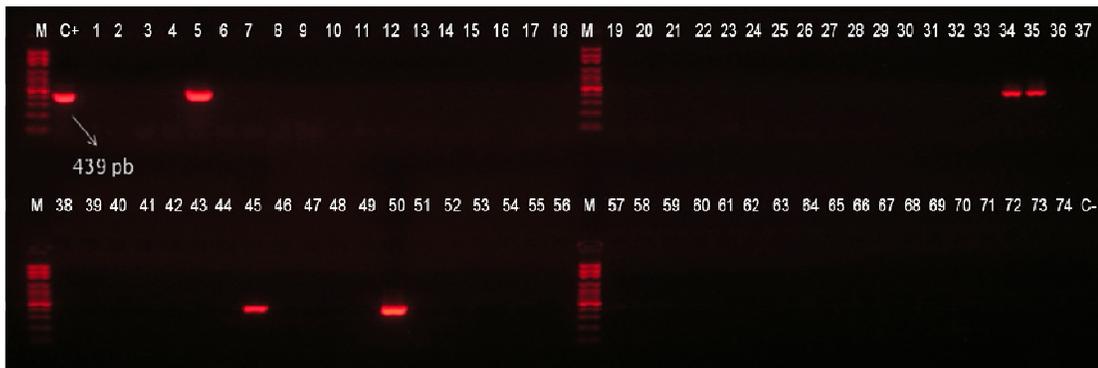


Figura 4. Presencia de *E. histolytica* por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen). C+: control positivo cepa NER de *E. histolytica* 439 pb. Pozos 1-74 muestras fecales evaluadas. C-: control negativo.

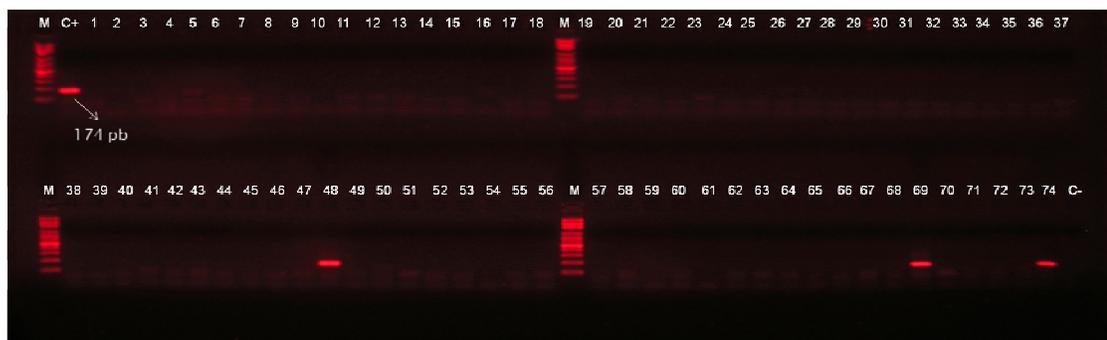


Figura 5. Presencia de *E. dispar* por nested PCR a partir de muestras fecales de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” Barcelona, estado Anzoátegui. M: marcador de masa molecular de 100 pb (Axigen). C+: control positivo cepa UDO de *E. dispar* 174 pb. Pozos 1-74 muestras fecales evaluadas. C-: control negativo.

El resumen de los resultados de la microscopia convencional y PCR se muestran en la tabla 3 donde se observa la distribución de especies detectadas por el método molecular, así como el elevado número de negativos de la PCR que fueron detectadas positivas a *E. histolytica* por la microscopia.

Tabla 3. Resultados de microscopia y PCR de muestras fecales provenientes de niños del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui.

Microscopia	Reacción en Cadena de la Polimerasa			Negativas	Total
	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica/E. dispar</i>		
<i>E. histolytica</i>	29	6	7	108	150

Cuando se analizaron los resultados obtenidos por PCR con respecto a la sintomatología de los niños y el diagnóstico coproparasitológico (Tabla 4), se observó que las infecciones por *E. histolytica* se presentaron principalmente en el grupo A donde se había identificado esta especie coproparasitológicamente como único patógeno 89,70% (26/29), mientras que las otras tres infecciones (10,30%) de esta especie se detectaron en el grupo C donde se acompañó con protozoarios comensales.

La diarrea fue el síntoma más común de estas infecciones por *E. histolytica* 62,10% (18/29), seguido de dolor abdominal 20,70% (6/29) y fiebre en el 13,80% de los niños evaluados (4/29). De igual forma, las infecciones por *E. dispar* e infecciones mixtas *E.h/E.d* fueron detectadas en el grupo A en un 100,00% (6/6) y 85,70% (6/7) respectivamente (Tabla 4), sólo una infección por *E. histolytica/E. dispar* se identificó en el grupo de los protozoarios comensales (grupo C). Los síntomas más frecuente en los niños fue la diarrea 66,60% (4/6) y la fiebre en el 33,30% (2/6) para las infecciones por *E. dispar*. Estas observaciones muestran que tanto *E. histolytica* como *E. dispar* se pueden identificar en el mismo grupo de

individuos con sintomatología intestinal. Por otro lado, hay que destacar el hecho de que no se detectó la especie *E. histolytica* en los grupos B y D (Tabla 4) donde coproparasitológicamente se había identificado esta especie patógena junto con protozoarios y helmintos intestinales patógenos, esto permite evidenciar las fallas del diagnóstico coproparasitológico con SSF y lugol para la diferenciación de las especies del género *Entamoeba*.

Tabla 4. Comparación del diagnóstico coproparasitológico, PCR y sintomatología en los niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.

Síntomas	A			B			C			D		
	<i>Eh</i>	<i>Ed</i>	M									
Diarrea aguda	17	4	4	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Fiebre	3	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Dolor abdominal	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Disentería	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asintomáticos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	26	6	6	0	0	0	3	0	1	0	0	0

Estudio coproparasitológico: (A: *E. histolytica*; B: *E. histolytica*, *G. duodenalis* y *B. hominis*; C: *E. histolytica*, *E. coli* y *C. mesnili*; D: *E. histolytica*, *T. trichiura* e *H. nana*). PCR: (*Eh*: *Entamoeba histolytica*; *Ed*: *Entamoeba dispar* M: infección mixta por *Eh/Ed*).

Del total de 150 muestras fecales positivas a *E. histolytica* por diagnóstico coproparasitológico diagnosticadas en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti”, 42 de las mismas fueron positivas por PCR y 108 negativas a todas las especies de *Entamoeba* diagnosticadas en esta investigación, lo cual permitió determinar un sobrediagnóstico de amibiasis del 72,00% (108/150) debido a que a todos estos niños se les reportó la especie patógena *E. histolytica*, esto evidencia la necesidad de aplicación de técnicas complementarias al diagnóstico coproparasitológico convencional para lograr diferenciación de estas especies del género *Entamoeba*, lo cual es de gran importancia para evitar la aplicación de tratamientos innecesarios.

Tabla 5. Características macroscópicas de las materias fecales positivas por PCR en los niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.

PCR	Consistencia		Moco		Sangre	
	Líquida	Blanda	Presente	Ausente	Presente	Ausente
<i>E. histolytica</i>	10	19	28	1	17	12
<i>E. dispar</i>	3	3	6	0	3	3
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	5	2	6	1	4	3
Negativos	47	61	0	0	0	0
Total	65	85	40	2	24	18

Tabla 6. Resumen del análisis estadístico de las características macroscópicas de la materia fecal, edad, sexo y sintomatología gastrointestinal, con respecto a las especies identificadas por PCR en las muestras de heces de niños provenientes del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.

Especie	Parámetro	Chi-cuadrado X ²	p
<i>E. histolytica</i>	Sexo	0,068	0,794
	Edad	1,071	0,586
	Diarrea	1,033	0,309
	Fiebre	0,000	1,000
	Consistencia	0,054	0,973
	Moco	0,220	0,639
	Sangre	4,753	0,029*
	Reacción	1,397	0,237
	Leucocitos	0,070	0,792
	Hematíes	0,130	0,718
<i>E. dispar</i>	Sexo	0,004	0,950
	Edad	0,274	0,872
	Diarrea	0,273	0,601
	Fiebre	0,421	0,515
	Consistencia	2,410	0,300
	Moco	1,358	0,244
	Sangre	0,727	0,394
	Reacción	0,007	0,935
Leucocitos	1,125	0,289	
Hematíes	0,000	0,997	

*Parámetro significativo P < 0,05

Por otro lado, cuando se analizó la información obtenida del análisis macroscópico de la materia fecal de las muestras positivas por PCR (Tabla 5), se

encontró que no hay un patrón característico para cada especie con respecto a la consistencia de las heces, ya que se encontraron distribuidas entre blandas y líquidas, aunque las infecciones mixtas predominaron en muestras líquidas 71,40% (5/7). Del mismo modo la presencia de sangre no fue exclusiva de la especie patógena, no obstante ésta estuvo asociada estadísticamente con *E. histolytica* ($X^2= 4,753$; $P < 0,05$) (Tabla 6), mientras que la presencia de moco en la materia fecal, se demostró en la mayoría de las infecciones por *E. histolytica*, *E. dispar* e infecciones mixtas *E.h/E.d* (Tabla 5).

DISCUSIÓN

En este estudio se determinó que la frecuencia de *Entamoeba histolytica* fue del 13,15% usando diagnóstico coproparasitológico de muestras fecales de niños de 0-10 años de edad que asistieron al Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui. Al respecto, la distribución mundial y la magnitud de las infecciones por *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* no es conocida, ya que la mayoría de los diagnósticos de estas especies se siguen basando en la observación microscópica que no permite diferenciarlas. Los datos actuales sugieren que *E. dispar* es 10 veces más común que *E. histolytica* en el mundo pero que las prevalencias locales pueden variar en forma significativa (Huston y Petri, 1999).

En general, las infecciones producidas por protozoarios intestinales predominaron en la población de niños evaluada, en donde el 19,30% de las infecciones por *E. histolytica* se acompañaron de otros protozoarios intestinales como *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili* y el 1,40% eran coinfecciones con huevos de helmintos intestinales como *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana*. Al respecto a las parasitosis intestinales, autores como Ouattara et al. (2008) señalan que el poliparasitismo por protozoarios intestinales es muy frecuente (80,20%) en grupos de 6-16 años, siendo las especies más frecuentes, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis* y el complejo *E. histolytica*/*E. dispar* con un 11,30%, confirmando esto la presencia y amplitud de estos microorganismos y concluyendo que la comprensión de la distribución de los mismos en áreas de transmisión de protozoarios patógenos, puede ayudar al desarrollo de programas de control de enfermedades, combinando las terapias con prevención.

Respecto a la prevalencia de *E. histolytica* en Venezuela, se reporta gran

variación en diferentes zonas de estudio. En el estado Trujillo, Miller et al. (2003) reportan por diagnóstico coproparasitológico 4,00% del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, mientras que en el estado Zulia, usando microscopía convencional reportó una prevalencia del 21,90% en una población de niños de 0-14 años de la Etnia Yukpa (Díaz et al., 2006), en cambio Rivero et al. (2009) usando PCR obtiene prevalencia de 10,78% en el Zulia en comparación con la microscopia que revelo un 20,58% del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, no encontrándose diferencias significativas con la edad y el sexo. Sin embargo, en el estado Bolívar, Devera (1998) reporta ausencia de éste protozooario intestinal, mientras que Mora et al. (2008), por su parte, reportó en individuos con síntomas gastrointestinales de Cumaná, estado Sucre, una frecuencia de 5,40% para *E. histolytica* y 3,50% *E. dispar*, empleando para ello PCR. De acuerdo a estos reportes realizados en los estados Bolívar y Sucre respectivamente, permiten inferir que en la población infantil evaluada de Barcelona, estado Anzoátegui la transmisión de la especie patógena *E. histolytica* es superior, lo cual queda demostrado coproparasitológicamente con un 13,15% y por PCR de 42 infecciones por *Entamoeba* el 19,30% correspondieron a esta especie.

En este sentido, Tasawar et al. (2010) determinaron un 21,69% (295 muestras) para esta especie de un total de 1 360 heces; sin embargo cuando relacionaron la edad con las infecciones por *E. histolytica*, encontraron que la prevalencia aumentaba en grupo de 1 a 15 años (30,82%) en comparación con un 17,34% en los individuos de 31 a 45 años de edad, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, otros autores como Parija y Khairnar (2007) reportan mayor prevalencia de *E. dispar* (8,80%) en comparación con la encontrada para *E. moshkovskii* y *E. histolytica* (2,20% y 1,70% respectivamente), señalando que el 81,00% de las infecciones sospechosas a *E. histolytica* son mal diagnosticadas.

Por otro lado, la información recolectada sobre la clínica presentada en cada uno de los niños evaluados para el momento de la toma de muestras, demostró que el

98,70% de las infecciones por *E. histolytica* reportadas coproparasitológicamente presentaron diversos síntomas (diarrea aguda 68,00%, síndrome febril 16,00%, dolor abdominal 12,70%, cuadro disentérico 2,00%) solo 1,30% no presentó síntomas gastrointestinales, lo cual puede ser posible debido a que los factores que determinan la virulencia de *E. histolytica* continúan siendo un enigma, porque las variables dependientes del parásito y del hospedador que contribuyen al desarrollo de la enfermedad no están claras; probablemente exista una interacción compleja entre la genética, inmunidad, nutrición y flora intestinal del hospedador y los rasgos genéticos del parásito. Una posibilidad es que el genotipo de la amiba determine su patogenicidad, esto por el hecho de que ciertos grupos de individuos infectados desarrollan la amibiasis extraintestinal sin mostrar aparentemente síntomas intestinales (Stanley et al., 1990; Clark y Diamond, 1993; Ghosh et al., 2000; Ayeh-Kumi et al., 2001; Zaki y Clark, 2001),

Otro punto importante de este estudio es la evidencia de un sobrediagnóstico de la especie patógena del 72,00% debido a que a los 150 niños evaluados solo se les reportó coproparasitológicamente la especie *E. histolytica*, esta sobreestimación quedó demostrado al analizar, por nested PCR, las muestras diagnosticadas del Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” donde solo el 28,00% (42/150) de las muestras fueron positivas a *Entamoeba*, de las cuales el 19,30% se les identificó *E. histolytica* con un fragmento de 439 pb, 6 infecciones (4,00%) fueron por *E. dispar* con un fragmento específico de 174 pb y 7 (4,70%) fueron infecciones mixtas por ambas especies. Además la PCR no detectó la especie *E. histolytica* en los grupos de niños donde coproparasitológicamente se había identificado esta especie patógena junto con protozoarios y helmintos intestinales patógenos, lo que permite inferir que posiblemente se están identificando otras estructuras como leucocitos polimorfonucleares, siendo esto influenciado por la falta de experiencia del personal del Laboratorio que realiza el diagnóstico coproparasitológico para la diferenciación de especies de *Entamoeba*.

Hay que señalar las fallas en el reporte del diagnóstico realizado en este centro asistencial evaluado, debido a que actualmente cuando la especiación es imposible, se recomienda reportar: "E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii" para describir la presencia de especies con morfología idénticas vistas en el examen de heces, en estos casos se recomienda el uso de nuevas tecnologías para esclarecer la verdadera epidemiología y la patogenia de *Entamoeba* spp., incluyendo la menos estudiada *E. moshkovskii* (Pritt y Clark, 2008).

Las posibles explicaciones del sobrediagnóstico encontrado en este estudio, empleando la microscopia convencional son variadas, empezando que este método es el menos confiable para identificar estas especies de *Entamoeba* en comparación con los cultivos o las pruebas de detección antigénica (Krogstad et al., 1978; Haque et al., 1995; Huston et al., 1999). Ésto debido a la baja sensibilidad de la microscopia (60,00%) generando falsos resultados debidos a errores de identificación de los macrófagos como trofozoítos, y polimorfonucleares (PMN) como quistes (especialmente cuando los lóbulos del núcleo de los PMN se rompen), y provoca confusión con especies de amibas (Gonzalez-Ruiz et al., 1994; Haque et al., 1995; Haque et al., 1997; Haque et al., 1998b; Tanyuksel y Petri, 2003).

Los trofozoítos de *Entamoeba* degeneran rápidamente en muestras fecales no fijadas (Proctor, 1991) y la refrigeración no es recomendada, por lo que se sugiere el uso de soluciones fijadoras (Schaudinn, mertiolato yodo formol, 5,00% o 10,00% de formalina, entre otras) que eviten la degradación de la morfología del parásito, para realizar métodos de concentración y coloraciones permanentes que permitan visualizar la presencia de glóbulos rojos en la citoplasma de la amiba, lo cual sigue siendo considerado para el diagnóstico de *E. histolytica* en pacientes con disentería y puede ser utilizado para distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar*, aunque los trofozoítos hematófagos no están presentes en la mayoría de los pacientes (Stracham et al., 1988; González-Ruiz et al., 1994,). Adicionalmente a las consideraciones

anteriores, se recomienda que los exámenes de la materia fecal para el diagnóstico de parásitos intestinales sean realizados con un mínimo de 3 muestras de heces de no más de 10 días, ya que estos organismos pueden ser excretados de forma intermitente o pueden estar distribuidos de forma desigual en las heces. Esto mejora la detección de los mismos entre un 85,00-95,00% (Li y Stanley, 1996).

De las 108 muestras diagnosticadas por microscopia convencional como *E. histolytica* que fueron negativas por PCR pudieran también explicarse por el hecho de que existen amibas intestinales similares morfológicamente a *E. histolytica* como *E. hartmanni* y *E. polecki*, y aunque esta última es un parásito de cerdos y monos y no es muy frecuente en el hombre; se ha reportado en Venezuela en 8 ocasiones en humanos (Chacín, 1980; Chacín, 1983; Chacín, 1992; Chacín et al., 1998).

La mayoría de las encuestas realizadas en el mundo antes de 1955, no reconocían *E. hartmanni* como una entidad separada (Burrows, 1957; Freedman y Elsdon-Dew, 1958; Burrows, 1959; Goldman et al., 1960) y aun después de esa fecha ha sido muy poco reportada en países en vías de desarrollo. En Venezuela, específicamente en el estado Zulia, *E. hartmanni* es comúnmente reportada en la región, de acuerdo a los estudios realizados desde 1976, usando técnicas de tinción y concentración (Chacín et al., 1976; Chacín y Bonpart, 1981; Chacín y Dikdan, 1981; Chacín et al., 1982; Chacín et al., 1990b; Chacín et al., 1993; Chacín et al., 1998; Chacín y Sánchez-Chávez, 2000), señalando estos estudios que es posible que por su pequeño tamaño no sea detectada a menudo en exámenes de heces al fresco o en material concentrado, o si se detectan los rasgos morfológicos pueden ser indistinguibles de otras especies del género que dificultan el diagnóstico específico. El uso de una preparación teñida y un micrómetro ocular puede contribuir a eliminar estas fuentes de error.

En cuanto a las características macroscópicas de las heces, son de gran

importancia a la hora de evaluar una muestra, para orientar la metodología diagnóstica, sin embargo, en esta investigación cuando se analizó la información obtenida del análisis macroscópico de la materia fecal de las muestras positivas por PCR no se observó un patrón característico para cada una de las especies de Entamoeba, en relación a la consistencia de las heces, del mismo modo, la presencia de moco en la materia fecal, se demostró en la mayoría de las infecciones por E. histolytica, E. dispar e infecciones mixtas E.h/E.d. De igual forma, la presencia de sangre no fue exclusiva de la especie patógena, sin embargo, esta característica mostró estar asociada estadísticamente con la especie E. histolytica. Estos resultados están respaldados por diferentes trabajos de investigación en donde se señala que a pesar de que E. dispar es considerada una especie comensal, también se ha identificado esta amiba en pacientes con síntomas gastrointestinales (Jetter et al., 1997; Visser et al., 2006; Fotedar et al., 2007; Parija y Khairnar, 2007). En la actualidad se sabe que el hematofagismo no es exclusivo de la amiba patógena, quedando demostrado que en algunos pacientes infectados con E. dispar también contienen glóbulos rojos (Haque et al., 1995). Por otro lado, en estudios in vitro se ha confirmado la capacidad de E. dispar para ingerir los glóbulos rojos (Trissl et al., 1978).

Todas estas dificultades mencionadas anteriormente para la identificación de especies de Entamoeba es lo que ha permitido que los métodos y los enfoques basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sean de elección para estudios clínicos y epidemiológicos en países desarrollados (Zaki et al., 2002; Calderaro et al., 2006; Hamzah et al., 2006; Haque y Petri, 2006) y han sido fuertemente respaldados por la Organización Mundial de la Salud. Usando las técnicas de biología molecular, E. histolytica ha podido ser identificada en una variedad de muestras clínicas, incluyendo heces, tejidos, abscesos hepáticos y aspirado (Tanyuksel y Petri, 2003).

Sin embargo, de acuerdo a la experiencia del Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del IIBCA-UDO con respecto a la extracción de ADN genómico a partir de la materia fecal, se considera este paso fundamental para lograr aplicar técnicas de biología molecular amplificando una determinada secuencia blanco, por ello en esta investigación se realizó una modificación del protocolo de extracción ya estandarizado en el LGM (Michelli, 2004; Mora, 2006; Rodríguez, 2009) con la finalidad de mejorar los productos de PCR, observando que guardando las muestras en PBS desde el momento de recolección de las muestras en el centro asistencial y la aplicación de sonicación para la ruptura de las formas quísticas, mejoró significativamente la calidad y cantidad de ADN genómico obtenido, así como la de los productos amplificados. Estos resultados son respaldados por los de Pinar et al. (2010) quienes evaluaron diferentes protocolos de extracción para la aplicación de PCR en tiempo real para detectar *E. histolytica*, concluyendo que la sensibilidad de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos afecta la sensibilidad de la amplificación de la PCR y por ello deben ser evaluados.

No obstante, la PCR amplificando secuencias de ARNr de la subunidad pequeña 18s ha evidenciado ser el mejor blanco genómico, por ser aproximadamente 100 veces más sensible que los kits de ELISA disponibles para diagnóstico (Mirelman et al., 1997; Troll et al., 1997), permitiendo la diferenciación *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras fecales, tal como lo reporta Nazemalhosseini et al. (2010), usando PCR para determinar prevalencia del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovskii*, en Teherán, Iran, donde analizaron 3 825 muestras fecales por microscopia, de las cuales 58 resultaron positivas al mismo, pero la PCR permitió identificar mayor número de infecciones para la especie *E. dispar* 53 (91,37%), seguidas de 2 (3,45%) *E. histolytica* y *E. moshkovskii*, respectivamente, y 1 infección mixta *E. dispar*/*E. moshkovskii* (1,75%), concluyendo que la PCR es una técnica alternativa para el diagnóstico de rutina de la amibiasis.

En el mismo orden de ideas, Hamzah et al. (2010) señalan que la PCR es un método rápido y sensible para diferenciar las amibas *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en humanos, permitiendo detectar hasta 0,2 pg del ADN de *E. histolytica* y hasta 2 pg del ADN de las otras dos especies respectivamente. Por otro lado, la técnica de PCR no ha mostrado reactividad cruzada con el ADN de otras especies de *Entamoeba*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* sp., *Escherichia coli*, u otros parásitos intestinales no patógenas (Liang et al., 2010). Esto también se evidencia en este estudio realizado en el Hospital “Luis Razetti” del estado Anzoátegui, al procesar muestras con diferentes protozoarios y helmintos intestinales patógenos y comensales del intestino humano, que se encontraron en coinfecciones con *E. histolytica*. Por ello, y por la alta sensibilidad de la nested PCR y PCR en tiempo real, Liang et al. (2010) concluyen que estos ensayos podrían simplificar el procesamiento en el diagnóstico de Laboratorio y facilitar las investigaciones epidemiológicas.

En diferentes regiones del mundo ha sido empleada la PCR en sus diferentes variaciones como diagnóstico de especies de *Entamoeba*, resaltándose en cada investigación las ventajas de esta técnica; citando el estudio de Ali et al. (2003) en Bangladesh donde emplearon esta metodología molecular en niños escolares, identificando mayor predominio de *E. dispar*, con 39 muestras positivas a esta especie (35,80%), seguido de *E. histolytica* (15,60%), y con (21,10%) *E. moshkovskii*. Mientras que en Sur África, Samie et al. (2006), evaluando muestras de hospitales y escuelas por PCR, reportan que *E. histolytica* se encontró en 37/197 (18,80%) y 1/47 (2,10%), y las infecciones por *E. dispar* fueron identificadas en 50/197 (25,30%) y 4/47 (8,50%), respectivamente, reportando además que *E. histolytica* estuvo significativamente asociada a diarrea e inflamación intestinal. Sin embargo, en Brasil, Carneiro et al. (2007) al evaluar 127 muestras fecales por microscopia, 27 (21,00%) presentaron el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, mientras que por multiplex PCR, solo 11 fueron positivas, de éstas 9 fueron *E. dispar* y 2 *E. histolytica*. De las

muestras negativas a la microscopia convencional, 3 fueron positivas a *E. dispar* y 1 a *E. histolytica*, destacando la baja sensibilidad de la microscopia convencional cuando se utiliza como único método para la identificación de estas especies.

En la actualidad, se cuenta con PCR en tiempo real el cual es un método reciente y muy atractivo para el diagnóstico de *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que con esta metodología se consume menos tiempo porque se eliminan los análisis post-PCR y se reducen los riesgos de resultados falsos positivos (Klein, 2002, Singh et al., 2009), aunque representa todavía un procedimiento costoso. El advenimiento de las técnicas moleculares más rápidas y menos costosas con la Lamp PCR (Liang et al., 2009) ha representado un gran avance en el diagnóstico clínico de la amebiasis, porque es una técnica molecular para ser desarrollada en el campo porque no requiere de termociclador ni de electroforesis, además de ser una técnica en la que se pueden dar resultados en dos o tres horas aproximadamente.

Los resultados de este estudio permiten concluir que el diagnóstico de las especies de *Entamoeba* por métodos convencionales requiere la aplicación de dos o tres técnicas que permitan dar un acercamiento de la especie implicada en el cuadro clínico, lo cual debe ser realizado por personal calificado y capacitado para ello. Además se requiere la aplicación de técnicas moleculares complementarias a los métodos convencionales que permita la identificación correcta de especies con alta sensibilidad, lo que contribuirá a un mejor manejo terapéutico de infecciones e incrementaría el conocimiento en la biología, diagnóstico y epidemiología de las especies de *Entamoeba* en las diferentes regiones de Venezuela donde se reporte transmisión de las mismas.

CONCLUSIONES

Se determinó un elevado sobrediagnóstico de la especie patógena en los niños evaluados, usando la microscopia convencional como método de diagnóstico.

La PCR mostró ser un método de diagnóstico óptimo, ya que permitió diferenciar las especies *E. dispar* y *E. histolytica*, así como descartar la presencia de *E. moshkovskii*, en las muestras fecales evaluadas en el Laboratorio del Anexo Pediátrico del Hospital “Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui.

Se evidenció que las infecciones por *E. histolytica* y *E. dispar* pueden ocurrir en el mismo grupo de niños sintomáticos, siendo la diarrea el síntoma más frecuente.

La presencia de sangre en las heces mostró asociación estadísticamente significativa con las infecciones por la amiba patógena *E. histolytica*.

BIBLIOGRAFIA

Abrego, P.; Cayyazo, M.; Ferreccio, C.; Guers, L.; Levine, M.; Ojeda, A. y Prado, V. 1991. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.*, 134: 614-627.

Ali, I.; Clark, C.; Haque, R.; Mondal, U.; Petri, W. y Roy, S. 2007. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 285-289.

Ali, I.; Haque, R.; Kabir, M.; Mondal, D.; Petri, W. y Roy, S. 2005. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 2168-2172.

Ali, I.; Hossain, M.; Roy, S.; Ayeh-Kumi, P.; Petri, W.; Haque, R. y Clark, C. 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 580-584.

Ali, I.; Solaymani-Mohammadi, S.; Akhter, J.; Roy, S.; Gorrini, C.; Calderaro, A.; Parker, S.; Haque, R.; Petri, W. y Clark, C. 2008. Tissue invasion by *Entamoeba histolytica*: Evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 2: 219.

Alla, M.; Blessmann, J.; Buss, H.; Dinh, B.; Jackson, T.; Ngo, Q.; Nu, P.; Ravdin, J.; Tannich, E. y Van, A. 2002. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 4413-4417.

Arenas-Pinto, A.; Certad, G.; Ferrara, G.; Castro, J.; Bello, M. y Núñez, L. 2003. Association between parasitic intestinal infections and acute or chronic diarrhoea in HIV-infected patients in Caracas, Venezuela. *Int. J. Std. AIDS.*, 14: 487-492.

Ayeh-Kumi, P.; Ali, I.; Lockhart, L.; Gilchrist, C.; Petri, W. y Hague, R. 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp. Parasitol.*, 99: 80-88.

Beltramino, M.; Ruggieri, J. y Villa, B. 1989. Prevalencia de enteroparasitosis en una población pediátrica de consultorios externos privados, de las ciudades de Reconquista y Avellaneda. *Rev. Méd. Santa Fe*, 22: 52-56.

Bern, C.; Martines, J.; Zoysa, I. y Glass, R. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ*, 70: 705-714.

Blessmann, J.; Van Linh, P.; Nu, P.; Thi, H.; Muller-Myhsok, B.; Buss, H. y Tannich, E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66: 578-583.

Blessmann, J.; Van, A. y Tannich, E. 2006. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. *Arch. Med. Res.*, 37: 270-272.

Boletín Epidemiológico. Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2007-2010. Dirección General de Epidemiología y Dirección de Vigilancia Epidemiológica. www.msds.gov.ve.

Boonyapisit, S.; Chinapak, O. y Plengvait, U. 1993. Amoebic liver abscess in Thailand, clinical analysis of 418 cases. *J. Med. Assoc. Thailand*, 76: 243-246.

Burrows, R. 1957. *Entamoeba hartmanni*. *Am. J. Hyg.*, 65: 172-188.

Burrows, R. 1959. Morphological differentiation of *Entamoeba hartmanni* and *E. polecki* from *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 8: 583-589.

Butcher, A.; Ellis, J.; Fotedar, R.; Harkness, J.; Marriott, D.; Stark, D. y Van Hal, S. 2008. Comparison of stool antigen detection kits with PCR for the diagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 368-371.

Butler, T.; Islam, M. y Wanke, C. 1988. Epidemiologic and clinical features of invasive amebiasis in Bangladesh: a case-control comparison with other diarrheal diseases and postmortem findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 335-341.

Calderaro, A.; Gorrini, C.; Bommezzadri, S.; Piccolo, G.; Dettori, G. y 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: 450-457.

Carneiro, H.; Saramago, R.; Werneck, H.; Muniz, M. y Peralta, J. 2007. Comparison of Multiplex-PCR and Antigen Detection for Differential Diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *Braz. J. Inf. Dis.*, 11(3): 365-370.

Chacín, L. 1980. Successful treatment of human *Entamoeba polecki* infection with metronidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 521-523.

Chacín, L. 1983. *Entamoeba polecki* infection in Venezuela. Report of a new case. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 137.

Chacín, L. 1992. *Entamoeba polecki* human infections in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86: 634.

Chacín, L. y Bonpart, D. 1981. A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30: 1201-1205.

Chacín, L.; Chacín-Martínez, E.; Espinoza, E. y Cárdenas, B. 1982. A seroepidemiological study of amebiasis in children of low socioeconomic level in Maracaibo, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 1103-1106.

Chacín, L. y Dikdan, Y. 1981. Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y otros parásitos intestinales en una comunidad suburbana de Maracaibo. *Invest. Clín.*, 22: 185-203.

Chacín, L.; Dikdan, Y.; Guanipa, N. y Villalobos, R. 1990b. Prevalencia de *Entamoeba histolytica* y otros parásitos intestinales en un barrio del municipio Mara, edo. Zulia, Venezuela. *Am. Trop. Med. Parasitol.*, 31: 3-15.

Chacín, L.; Guanipa, N. y Arapé-García, R. 1976. Prevalencia de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni* y otros parásitos intestinales en niños hospitalizados. *Invest. Clín.*, 17: 25-41.

Chacín, L.; Guanipa, N.; Cano, G.; Parra, A.; Estévez, J. y Raleigh, X. 1998. Epidemiological study of intestinal parasitic infections in a rural area from Zulia state, Venezuela. *Interciencia*, 23: 241-247.

Chacín, L.; Mathews, H. y Guanipa, N. 1990a. Estudio Seroepidemiológico de la amibiasis en una comunidad del Zulia, Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 32: 467-473.

Chacín, L.; Mejía-Young, M.; Cano, G.; Guanipa, N.; Estévez, J. y Bonilla, E. 1993. *Cryptosporidium* infections in a suburban community in Maracaibo, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49: 63-67.

Chacín, L. y Sánchez-Chávez, Y. 2000. Intestinal parasitic infections, with special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 347-352.

Chadee, K.; Smith, J. y Meerovitch, E. 1985. *Entamoeba histolytica*: electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of

gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 870-878.

Chester, P.; Clifton, R. y Wayne, E. 1992. *Parasitología Médica*. Primera edición. Salvat editors S.A., Barcelona, España.

Chiodini, P.; Furrows, S. y Moody, A. 2004. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Pathol.*, 57: 1264-1266.

Chomlasak, K.; Higa, N.; Insisiengmay, S.; Iwanaga, M.; Munnalath, K.; Nakasone, N.; Phanthauamath, B.; Phounane, T.; Sisavath, L.; Sisulath, P.; Sithivong, N.; Vongsanith, P. y Yamashiro, T. 1998. Etiologic study of diarrheal patients in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2195-2199.

Clark, C. y Diamond, L. 1991a. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 49: 297-302.

Clark, C. y Diamond, L. 1991b. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46: 11-18.

Clark, C. y Diamond, L. 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp. Parasitol.*, 77: 450-455.

Devera, R. 1998. Ausencia de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Biomed.*, 9: 199-201.

Diamond, L. y Clark, C. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walder, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt. 1925. *J. Euk. Microbiol.*, 40: 340-344.

Díaz, A.; Rivero, R.; Bracho, M.; Castellanos, S.; Acurero, E.; Carchi, L. y Atencio, T. 2006. Prevalence of intestinal parasites in children of Yukpa Ethnia in Toromo, Zulia State, Venezuela. *Rev. Med. Chil.*, 134: 72-78.

Dreyer, D. 1961. Growth of a strain of *Entamoeba histolytica* at room temperature, Texas. *Rep. Biol. Med.*, 19: 393-396.

Espinosa-Cantellano, M.; Castañón, G. y Martínez, A. 1997. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.*, 28: 204-206.

Espinosa-Cantellano, M.; González, A.; Chávez, B.; Castañón, G.; Argüello,

C.; Lázaro, A. y Martínez, A. 1998. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties, and cytopathic effect. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45: 265-272.

Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J. y Harkness, J. 2007. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 1035-1037.

Freedman, L. y Elsdon-Dew, R. 1958. Size variation in *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 181: 433-434.

García, L. y Bruckner, D. 1997. *Diagnostic medical parasitology*. ASM. Press. Washington. DC.

Gathiram, V. y Jackson, T. 1987. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S. Afr. Med. J.*, 72: 669-672.

Ghosh, S.; Frisardi, M.; Ramirez-Avila, L.; Descoteaux, S.; Sturm-Ramirez, K.; Newton-Sanchez, O.; Santos-Preciado, J.; Ganguly, C.; Lohia, A.; Reed, S. y Samuelson, J. 2000. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3815-3821.

Goldman, M.; Carver, R. y Gleason, N. 1960. Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. II. *E. histolytica* and *E. hartmanni*. *Exper. Parasitol.*, 10: 366-388.

González-Ruiz, A.; Haque, R. y Aguirre, A. 1994. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.*, 47: 236-239.

Hamzah, Z.; Petmitr, S.; Mungthin, M.; Leelayoova, S. y Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. 2006. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 3196-3200.

Hamzah, Z.; Petmitr, S.; Mungthin, M.; Leelayoova, S. y Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. 2010. Development of multiplex real-time polymerase chain reaction for detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in clinical specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(4): 909-913.

Haque, R.; Ali, I.; Clark, C. y Petri, W. 1998a. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitol. Int.*, 47: 201-202.

Haque, R.; Ali, I.; Akther, S. y Petri, W. 1998b. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 449-452.

Haque, R.; Faruque, A.; Hahn, P.; Lyerly, D. y Petri, W. 1997. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J. Infect. Dis.*, 175:734-736.

Haque, R.; Huston, C.; Hughes, M.; Houpt, E. y Petri, W. 2003. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1563-1573.

Haque, R.; Ibnekarim, M. y Petri, W. 1999. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 1031-1034.

Haque, R.; Lyerly, D.; Petri, W. y Vines, R. 2000. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol. Today*, 16: 320-321.

Haque, R.; Neville, L.; Hahn, P. y Petri, W. 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2558-2561.

Haque, R. y Petri, W. 2006. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch. Med. Res.*, 37: 273-276.

Huston, C.; Haque, R. y Petri, W. 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 22: 1-11.

Huston, C. y Petri, W. 1999. Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 1: 441-447.

Idänpään-Heikkilä, J. 2001. Ethical principles for the guidance of physicians in medical research-the Declaration of Helsinki. *Bull. WHO*. 79(4): 279.

Jackson, T. 2000. Epidemiology. En: Ravdin JIEd. Amebiasis. London: Imperial College Press, 2: 47-63.

Jetter, A.; Walderich, B.; Britten, D.; Mete, O.; Goral, V.; Burchard, G. y Ackers, J. 1997. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in eastern Turkey using a colorimetric polymerase chain reaction. *Arch. Med. Res.*, 28: 319-321.

Kimura, K.; Stoopan, M.; Reeder, M. y Moncada, R. 1997. Amebiasis: Modern

diagnostic imaging with pathological and clinical correlation. *Semin. Roentgenol.*, 32: 250-275.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends. Mol. Med.*, 8: 257-260.

Krogstad, D.; Spencer, H.; Healy, G.; Gleason, N.; Sexton, D. y Herron, C. 1978. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Ann. Intern. Med.*, 88: 89-97.

Liang, S.; Chan, Y.; Hsia, K.; Lee, J.; Kuo, M.; Hwa, K.; Chan, C.; Chiang, T.; Chen, J.; Wu, F. y Ji, D. 2009. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 1892-1895.

Liang, S.; Hsia, K.; Chan, Y.; Fan, C.; Jiang, D.; Landt, O. y Ji, D. 2010. Evaluation of a new single-tube multiprobe real-time PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J. Parasitol.*, 96(4): 793-797.

Li, E. y Stanley, S. 1996. Protozoa. Amebiasis. *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, 25: 471-492.

McMillan, A.; Gilmour, H.; McNeillage, G. y Scott, G. 1984. Amoebiasis in homosexual. *Men. Gut.*, 25: 356-360.

Michelli, E. 2004. Diagnóstico molecular y tradicional de patógenos intestinales relacionados con la etiología de cuadros clínicos diarreicos. Tesis de Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

Miller, S.; Rosario, C.; Rojas, E. y Scorza, J. 2003. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop. Med. Int. Health*, 8: 342-347.

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

Mora, L. 2006. Caracterización molecular y epidemiología de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre. Tesis de Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

Mora, L.; García, A. y De Donato, M. 2005. Prevalencia del complejo *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con síntomas

gastrointestinales de diarrea procedentes de Cumaná, estado Sucre. *Kasmera*, 1: 36-45.

Mora, L.; García, A.; De Donato, M. y Urdaneta, H. 2008. Estudio epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. *Invest. Clín.*, 49(2): 225-237.

Morales, G. y Pinto, L. 1995. *Parasitometría*. Clemente editores, C.A.

Nazemalhosseini, E.; Nochi, Z.; Sahebkhitiari, N.; Rostami, M.; Dabiri, H.; Zali, M.; Kazemi, B. y Haghghi, A. 2010. Discrimination of *Entamoeba moshkovskii* in patients with gastrointestinal disorders by single-round PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63(2): 136-138.

Ohnishi, K. y Murata, M. 1997. Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. *Epidemiol. Infect.*, 119: 363-367.

Ortner, S.; Clark, C.; Binder, M.; Scheiner, O.; Wiedermann, G. y Duchene, M. 1997. Molecular biology of the hexokinase isozyme pattern that distinguishes pathogenic *Entamoeba histolytica* from nonpathogenic *Entamoeba dispar*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 86: 85-94.

Ouattara, M.; Silué, K.; N'Guéssan, A.; Yapi, A.; Barbara, M.; Raso, G.; Utzinger, J. y N'Goran, E. 2008. Prevalence and polyparasitism of intestinal protozoa and spatial distribution of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *Giardia intestinalis* from pupils in the rural zone of Man in Côte d'Ivoire. *Sante*, 18(4): 215-222.

Parija, S. y Khairnar, K. 2007. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *J. Health Pop. Nutr.*, 23: 292-295.

Pinar, A.; Akyön, Y.; Alp, A. y Ergüven, S. 2010. Adaptation of a sensitive DNA extraction method for detection of *Entamoeba histolytica* by real-time polymerase chain reaction. *Microbiol. Bul.*, 44(3): 453-459.

Pritt, B. y Clark, G. 2008. Amebiasis. *Mayo. Clin. Proc.*, 83 (10): 1154-1160.

Proctor, E. 1991. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin. Lab. Med.*, 11: 829-859.

Pumarola, A.; Rodríguez, A.; García, J. y Piedrota, A. 1991. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2^{da} Edición. Editorial Científica y técnica, S.A. Barcelona,

España.

Rashidul, M.; Huston, C.; Hughes, M.; Houpt, E. y Petri, M. 2005. Amebiasis. *N. Engl. Med.*, 16: 348.

Rivero, Z.; Bracho, A.; Calchi, M.; Díaz, I.; Acurero, E.; Maldonado, A.; Chourio, G.; Arráiz, N. y Corzo, G. 2009. Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del estado Zulia, Venezuela. *Cad. Saúde Pública*, 25:151-159.

Rodríguez, M. 2009. *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Tesis de pregrado. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

Saklatvala, T. 1993. Milestones in parasitology. *Parasitol. Today*, 9: 347-348.

Samie, A.; Obi, L.; Bessong, P.; Stroup, S.; Houpt, E. y Guerrant, R. 2006. Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(3): 565-571.

Sargeant, P.; Williams, J. y Grene, J. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isozyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72: 519-521.

Scaglia, M.; Gatti, S.; Strosselli, M.; Grazioli, V. y Villa, M. 1983. *Entamoeba moshkovskii* (Tshalaia, 1941): morpho-biological characterization of new strains isolated from the environment, and a review of the literature. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58: 413-422.

Schnell, S. y Mendoza, C. 1997. Theoretical description of the polymerase chain reaction. *J. Theor. Biol.*, 3: 31-38.

Shandera, W.; Bollam, P.; Hashmey, H.; Athey, P.; Greenberg, S. y White, A. 1998. Hepatic amebiasis among patients in a public teaching hospital. *South Med. J.*, 91: 829-837.

Singh, A.; Houpt, E. y Petri, W. 2009. Rapid Diagnosis of Intestinal Parasitic Protozoa, with a Focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 136(7): 765-769.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1996. *Introducción a la Bioestadística*. Editorial Reverté. S.A. Barcelona, España.

Stanley, S. 2003. Amoebiasis. *Lancet*, 361: 1025-1034.

Stanley, S.; Becker, L.; Kunz-Jenkins, C.; Foster, L. y Li, E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 4976-4980.

Stauffer, W. y Ravdin, J. 2003. *Entamoeba histolytica*, an update. *Curr. Opin. Infect.*, 16: 479-485.

Stracham, W.; Chiodini, P.; Spice, W.; Moody, A. y Ackers, J. 1988. Immunological differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *E. histolytica*. *Lancet*, 1: 561-563.

Takeuchi, T.; Okuzawa, E.; Nozaki, T.; Kobayashi, S.; Mizokami, M.; Minoshima, N.; Yamamoto, M. y Isomura, S. 1989. High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection. *J. Infect. Dis.*, 159: 808.

Tanyuksel, M. y Petri, W. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 713-729.

Tanyuksel, M.; Ulukanligil, M.; Guclu, Z.; Araz, E.; Koru, O. y Petri, W. 2007. Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 723-724.

Tasawar, Z.; Kausar, S. y Lashari, M. 2010. *Prevalence of Entamoeba histolytica* in humans. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23(3): 344-348.

Temesvari, L.; Harris, E.; Stanley, S. y Cardelli, J. 1999. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several ras-related Rab GTPases. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 103: 225-241.

Trissl, D.; Martinez-Palomo, A.; De la Torre, M.; De la Hoz, R. y Perez de Suarez, E. 1978. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.*, 148: 1137-1143.

Troll, H.; Marti, H. y 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: 1701-1705.

Tshalaia, L. 1941. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Med. Parazit. Moscow*, 10: 244-252.

Valdez, E.; Martínez, M.; Gómez, A.; Cedillo, E.; Arellano, J.; Pérez, M.; Ramos, F.; Morán, P.; González, E.; Valenzuela, O. y Melendro, E. 1999. HLA characterization in adult asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. *Parasitol. Res.*, 85: 833-836.

Variyam, E. 1993. Bile salts promote adherence-decreasing effect of colonic luminal hydrolases on *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.*, 23: 223-225.

Visser, L.; Verweij, J.; Van Esbroeck, M.; Edeling, W.; Clerinx, J. y Polderman, A. 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: 397-403.

Vohra, H.; Bhatti, H.; Ganguly, N. y Mahajan, R. 1989. Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*, (Indian strains) in guinea pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83: 648-650.

World Health Organization Amoebiasis. 1997b. *WHO. Weekly Epidemiol. Rep.*, 72: 97-100.

World Health Organization, Division of Diarrhoeal and Acute Disease Control. 1995. Integrated management of the sick child. *Bull World Health Organ*, 73: 735-740.

World Health Organization, News and Activities. 1997c. *Entamoeba* taxonomy. *Bull. W. H. O.*, 75: 291-292.

World Health Organization Report of a consultation of experts on amoebiasis. 1997a. *Weekly Epidemiol. Rep.*, 72: 97-99.

Yau, Y.; Crandall, I. y Kain, K. 2001. Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 716-719.

Zaki, M. y Clark, C. 2001. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 897-905.

Zaki, M.; Meelu, P.; Sun, W. y Clark, C. 2002. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1271-1276.

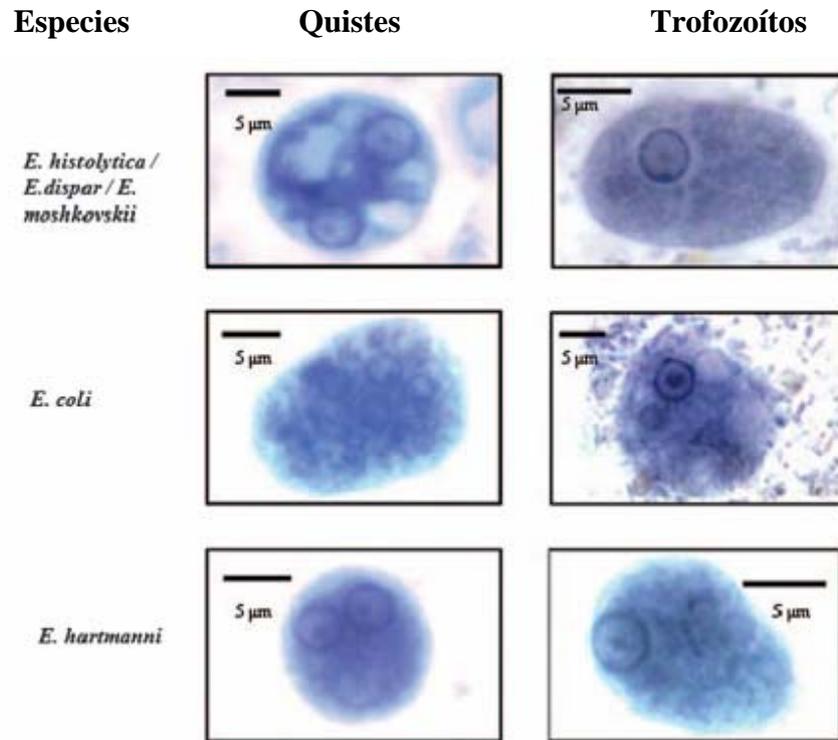
ANEXOS

ANEXO I
CARACTERÍSTICAS DE TROFOZOÍTOS Y QUISTES DE ESPECIES DE *Entamoeba* QUE CAUSAN COMÚNMENTE
INFECCIONES INTESTINALES EN HUMANOS

CARACTERÍSTICAS		<i>E. histolytica/ E. dispar/ E. moshkovskii</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. polecki</i>
PREPARACIONES HUMEDAS	TROFOZOÍTOS (Tamaño, núcleo y movimiento)	15-20 µm, 1 núcleo (observación difícil en preparaciones no coloreadas) móviles y pseudópodos en forma de dedo.	8-10 µm, 1 núcleo (observación difícil en preparaciones no coloreadas), el movimiento es no progresivo.	20-25 µm, 1 núcleo a menudo visible, pseudópodos lentos, cortos.	15-20 µm, 1 núcleo de vez en cuando visible en preparaciones húmedas, inactivos.
	QUISTES (Tamaño y núcleo)	10-15 µm, quistes maduros con 4 núcleos, quistes inmaduros de 1 a 2 núcleos, las características nucleares son difíciles de observar en preparaciones húmedas.	6-8 µm, quiste maduro con 4 núcleos; quistes inmaduros tienen 1 a 2 núcleos, quistes con 2 núcleos son muy comunes.	15-25 µm, los quistes maduros tienen 8 núcleos, ocasionalmente pueden tener 16 o más núcleos.	10-15 µm, quiste maduro presenta 1 núcleo, muy rara vez de 2 a 4 núcleos.
PREPARACIONES COLOREADAS: CROMATINA, CARIOSOMA Y CITOPLASMA	TROFOZOÍTOS	Cromatina periférica, puede tener apariencia de perlas. Cariosoma pequeño, compacto y centralmente localizado, pero puede ser excéntrico. El citoplasma es fino, granular y puede contener bacterias; la presencia de glóbulos rojos (GR) es diagnóstico de <i>E. histolytica</i> , aunque algunas cepas de <i>E. dispar</i> pueden muy ocasionalmente contener GR.	El núcleo puede colorearse más manchado que <i>E. histolytica</i> , la cromatina puede aparecer como un anillo sólido más bien como perlas. Cariosoma pequeño y compacto; centralmente localizado o excéntrico. Citoplasma finamente granular puede contener bacterias pero no fagocita GR.	Cromatina aglomerada y desigualmente arreglada, aparecen como anillos sólidos sin perlas. Cariosoma largo, no compacto, puede o no ser excéntrico, puede ser difuso o manchado. Citoplasma granular con diferenciación entre citoplasma y endoplasma. Bacterias, levaduras y otros detritus pueden estar presentes.	Cromatina finamente granular, también puede ser aglomerada en uno o ambos bordes de membrana. Cariosoma pequeño y localizado en posición central. Citoplasma finamente granular y pueden contener bacterias ingeridas.
	QUISTES	Cromatina periférica con gránulos finos y uniformemente distribuidos. El cariosoma es pequeño compacto, localizado en posición central pero ocasionalmente es excéntrico. En el citoplasma pueden estar presentes cuerpos cromatoidales con extremos redondeados. La cromatina puede ser difusa en el quiste maduro, y masa de cromatina aglomerada, puede estar presente en quistes inmaduros.	Gránulos de cromatina distribuidos uniformemente (características nucleares difíciles de observar). Cariosoma pequeño, compacto y generalmente en posición central. Usualmente en el citoplasma presenta cuerpos cromatoidales. La cromatina puede o no puede estar presente.	Cromatina toscamente granular, puede estar aglomerada y arreglada sin uniformidad. Cariosoma largo, excéntrico, puede estar en posición central. En el citoplasma pueden estar presentes pero menos frecuentes que en <i>E. histolytica</i> los cuerpos cromatoides pero con extremos puntiagudos, pueden ser difusos o ausentes en quistes maduros, en estos se ven aglomerados.	Cromatina finamente granular. Cariosoma pequeño y usualmente localizado en posición central. En el citoplasma abundantes cuerpos cromatoidales con extremos angulares puntiagudos. La mitad de los quistes contienen inclusiones esféricas u ovoidales en masa.

Tomado de: García y Bruckner, 1997; Haque *et al.*, 1998; Tanyuksel y Petri, 2003.

ANEXO II
QUISTES Y TROFOZOÍTOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Entamoeba*



Tomado de: García y Bruckner, 1997; Haque *et al.*, 1998; Tanyuksel y Petri, 2003.

ANEXO III
DATOS PERSONALES Y DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO

Número de Muestra:

--	--	--

Fecha: ___/___/___

Nombres: _____ Apellidos: _____

Edad: ___ meses/años

Sexo: F

M

Síntomas: _____

Diagnóstico coproparasitológico

Examen físico

Color _____ Aspecto _____ Reacción _____

Olor _____ Consistencia _____ Moco _____

Sangre _____ Otros _____

Examen microscópico

Helminths _____

Protozoarios _____

Otros _____

ANEXO IV
CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (CPI)

El género *Entamoeba* comprende un conjunto de especies parásitos del intestino humano: *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba hartmanni* y *Entamoeba histolytica*, siendo esta última la especie implicada en cuadros patológicos en humanos. Aunque diversos estudios reportan la presencia de *E. dispar* y *E. moshkovskii* en pacientes con síntomas gastrointestinales, no existe hasta el momento evidencias definitivas que demuestren que estas dos especies causan sintomatología gastrointestinal en el hombre. Mientras que la especie *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis intestinal y es considerada mundialmente como uno de los parásitos principales que causa mortalidad en humanos. Por ello, nos planteamos como objetivo “Detectar por nested PCR las especies de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras fecales provenientes de pacientes del Laboratorio del anexo pediátrico del “Hospital Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos”. Este es un estudio de diagnóstico, el cual se realiza por medio del análisis de muestras de heces para detectar e identificar la presencia de quistes y/o trofozoítos del género *Entamoeba* por microscopia convencional y diagnóstico molecular por el método de PCR. La presente investigación se llevará a cabo bajo la responsabilidad de investigadores del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente. El uso de las muestras y datos aquí obtenidos son de uso exclusivo para investigación. Los datos de los participantes serán mantenidos anónimos y la información recogida no podrá ser utilizada en perjuicio de los participantes.

Yo _____ portador de la C.I: _____ doy fe de conocer sobre el estudio y autorizo a los responsables del presente estudio a utilizar mis datos y muestras de heces.

Firma del Participante: _____

Firma del Investigador responsable: _____

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE Entamoeba EN MUESTRAS FECALES PROVENIENTES DE PACIENTES DEL ANEXO PEDIÁTRICO DEL “HOSPITAL LUIS RAZETTI” DE BARCELONA, ESTADO ANZOÁTEGUI Y SU RELACIÓN CON SÍNTOMAS CLÍNICOS.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bachkanji Ahmar, Beatriz	CVLAC	17.539.970
	e-mail	Lic.bea_ahmar@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba moshkovskii
PCR

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En esta investigación se planteó detectar por nested PCR las especies de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* en muestras fecales provenientes de pacientes del Anexo Pediátrico del Hospital “Dr. Luis Razetti” de Barcelona, estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos. Para ello, de un total de 1 141 muestras de heces analizadas en dicho Laboratorio durante enero-agosto 2009, se muestrearon 150 heces de niños de 0-10 años y ambos sexos, diagnosticados coproparasitológicamente positivos a *E. histolytica*. Adicionalmente se obtuvo información de las características físicas de las muestras, signos y síntomas al momento del muestreo y el reporte de todos los helmintos y protozoarios intestinales identificados microscópicamente en cada una de las muestras evaluadas. Estas fueron colocadas en amortiguador fosfato salino (PBS) hasta su posterior procesamiento. A todas las 150 muestras se les realizó extracción de ADN genómico empleando el kit de extracción de ADN Wizard Genomic® de Promega y se aplicó la nested PCR amplificando la secuencia de ARNr 16S para detectar el género *Entamoeba* (898 pb) e identificar las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* con fragmentos de 439 pb, 174 pb y 553 pb, respectivamente. La asociación de las variables edad, sexo, sintomatología y características macroscópicas de las heces, con respecto a las especies de *Entamoeba* identificadas, fueron asociadas a través de la prueba Chi-cuadrado, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11,5. Los resultados demostraron una frecuencia de diagnóstico de *E. histolytica* del 13,15% en el centro asistencial evaluado (150/1 141), de las heces positivas a *E. histolytica* el 79,30% de las mismas presentó esta especie como único patógeno, 19,30% de los casos de *E. histolytica* estaban coinfectados con otros protozoarios como *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili* y el 1,40% estuvo acompañada con helmintos intestinales como *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana*. Sin embargo, cuando estas muestras positivas se analizaron por nested PCR se demostró que sólo el 28,00% (42/150) de las mismas presentaron infecciones por *Entamoeba*, evidenciándose elevado sobrediagnóstico de *E. histolytica* (72,00%) en la población infantil evaluada. Además, el método molecular permitió diferenciar 29 infecciones por *E. histolytica* (19,30%), 6 (4,00%) por *E. dispar*, y 7 (4,70%) infecciones mixtas *E. histolytica/E. dispar*. No se observó amplificación de la especie *E. moshkovskii* en las muestras evaluadas. Por otro lado, según los signos y síntomas de los niños evaluados, la diarrea fue el más común de estas infecciones, seguido de dolor abdominal y fiebre; sin embargo, tanto *E. histolytica* como *E. dispar* fueron identificadas en los mismos grupos de individuos sintomáticos. De igual forma, las características macroscópicas de las heces no mostró un patrón característico de especies y a pesar de que la presencia de sangre demostró una asociación estadísticamente significativa con *E. histolytica*, en algunas infecciones por *E. dispar* también se reportó presencia de sangre en la materia fecal. En conclusión, la técnica de PCR evidenció ser más útil en la detección e identificación de las especies del género *Entamoeba*, demostrando que el diagnóstico coproparasitológico genera sobrediagnóstico de la especie patógena *E. histolytica*, la cual está asociada estadísticamente a la presencia de sangre en las heces.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Rodulfo, Hectorina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11.831.659
	e-mail	hrodulfo2002@yahoo.es
	e-mail	
De Donato, Marco	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	7.259.865
	e-mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e-mail	
Guilarte, Del Valle	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.306.352
	e-mail	delguifa@gmail.com
	e-mail	
Mora, Leonor	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.273.164
	e-mail	moralobianco@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	06	03

Lenguaje: spa _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-BeatrizAhmar.doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis _____

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura _____

Área de Estudio:

Bioanálisis _____

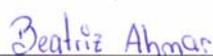
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente (UDO) _____

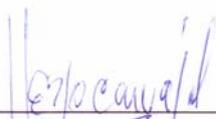
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

Derechos:

Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales. Solo le damos el derecho de publicar el resumen de dicho trabajo.



**Br. Beatriz Ahmar B.
AUTOR**



**Profa. Hectorina Rodulfo
Asesora**



**Prof. Marco De Donato
Co-Asesor**



**Profa. Del Valle Guilarte
JURADO 1**



**Profa. Leonor Mora
JURADO 2**

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

