



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

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
(Modalidad: Investigación)

MARÍA EUGENIA RODRÍGUEZ CHÓPITE

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

CUMANA, 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

APROBADO POR:

Profa. Leonor Mora Vargas
Asesora

Profa. Hectorina Rodulfo
Co-Asesora

Profa. Del Valle Guilarte
Jurado Principal

Profa. Erika Gómez
Jurado Principal

DEDICATORIA

A
Dios Todopoderoso.

Mi madre, por sus valiosos consejos y su apoyo incondicional, por demostrarme que si se puede. Te amo mami.

Mi padre, por su amor y paciencia en el logro de mi meta como profesional. Te amo papi.

Mi hermana, por estar siempre a mi lado y por ser un ejemplo de trabajo y constancia en todo lo que realiza. Te quiero Mery.

Mi hermano, por ser una persona muy especial, que este logro te sirva de ejemplo. Te quiero Luis, eres lo máximo.

Mi abuela, por sus cariños y cuidados.

Mis amigos Paola y Sebastián, por la autenticidad de su amistad.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesora Prof. Leonor Mora, por los conocimientos aportados y su valiosa orientación para la realización de este trabajo.

Mi co-asesora Prof. Hectorina Rodulfo, por su apoyo y ayuda profesional.

El Dr. Marcos De Donato, por su contribución a este trabajo.

Mis compañeras: Risela, Celenys, Cinthia, Rosalid, Ademarys y Rosario por su apoyo y compañía en el transcurso de mi carrera.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	I
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	I
RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN	II
Población.....	I
Procesamiento de las muestras.....	II
Diagnóstico coproparasitológico.....	II
Diagnóstico molecular	III
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	IV
Primera reacción.....	V
Segunda reacción	V
Análisis estadístico.....	VI
RESULTADOS.....	VII
DISCUSIÓN	II
CONCLUSIONES	I
BIBLIOGRAFÍA	II

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Frecuencia de protozoarios y helmintos intestinales identificados por examen directo de las heces de individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	VIII
Tabla 2. Frecuencia de <i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>Entamoeba dispar</i> por métodos parasitológicos en individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	X
Tabla 3. Resultados del análisis de la asociación por regresión logística binaria y prueba de Kappa entre el diagnóstico microscópico del complejo <i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>Entamoeba dispar</i> con la presencia de otros parásitos.....	X
Tabla 4. Frecuencia de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> a través del método molecular en individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	XIII
Tabla 5. Frecuencia de signos y síntomas clínicos en individuos infectados por <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> diagnosticados por Nested-multiplex PCR.	I
Tabla 6. Resultados del análisis de la asociación por regresión logística binaria entre el diagnóstico microscópico del complejo <i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>Entamoeba dispar</i> con las variables clínicas y epidemiológicas.	I

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografía de *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar*. Quistes coloreados con solución de lugol (A). Quiste inmaduro de *E. histolytica* y/o *E. dispar* en solución de Quensel donde se observa el cuerpo cromatoide (B). Quiste inmaduro de *E. histolytica* y/o *E. dispar* coloreado con solución tricrómica donde se observa el cuerpo cromatoide (C)..... IX
- Figura 2. Extracción de ADN genómico a partir de muestras fecales ADN obtenido de las muestras evaluadas donde se observa degradación del mismo (pozos 2-9) B) ADN sin degradación (pozos 2-15), marcador de peso molecular de 1 Kb (pozo 1 figura 2A y B). Gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio (0,5µg/mL). XI
- Figura 3. Productos amplificados por nested-multiplex PCR del gen de ARN ribosomal que amplifica un fragmento mayor específico de *Entamoeba histolytica* y uno menor específico de *Entamoeba dispar*. EhIULA, EhNER y EdUDO402 son controles positivos para cada especie y M: marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Números 01-06 muestras positivas y 07-08 muestras negativas, 09 control negativo..... XII

RESUMEN

La redescrición de *E. histolytica* como especie patógena, causante de la amibiasis con respecto a *E. dispar*, reconociéndola como especie comensal, ha cambiado claramente la visión en el enfoque del cuadro clínico, el diagnóstico y el tratamiento de estas infecciones. En Venezuela, el diagnóstico de laboratorio se realiza a través del examen coproparasitológico de la materia fecal por observación microscópica, dado que son dos especies morfológicamente indistinguibles, esto conduce a la aplicación de tratamientos erróneos que conducen a los individuos a infecciones más severas y complicaciones secundarias. En este sentido, el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar la frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Para ello se analizaron 317 muestras fecales de individuos sintomáticos y asintomáticos de ambos sexos y diferentes grupos etarios, aplicando consentimiento informado y una encuesta clínica a cada individuo. Se analizaron por métodos coproparasitológicos: examen directo solución salina fisiológica al 0,85%, lugol, Quensel y coloración tricómica. El diagnóstico molecular se realizó a partir de la materia fecal utilizando el kit Wizard Genomic® de Promega, amplificando por Nested- multiplex PCR la subunidad pequeña de ARN 16S. En la población evaluada se registró un 62,14% de infecciones por protozoarios y helmintos intestinales a través del método directo, donde *Blastocystis hominis* (47,00%) fue el más frecuente, seguido de *Giardia duodenalis* (9,15%) y el complejo *E. histolytica/E. dispar* (6,94%). El diagnóstico de este último varió dependiendo del método empleado, observando que de 22 casos detectados por el examen directo, solo 10 (3,15%) se identificaron con la coloración tricrómica. Al realizar detección e identificación de estas especies por PCR se encontraron 4 casos sintomáticos de *E. histolytica* (1,26%) y 3 de *E. dispar* (0,95%), estos últimos distribuidos en individuos sintomáticos (2) y asintomáticos (1). Las variables clínicas: moco, náuseas, dolor abdominal y vómitos se encontraron asociadas significativamente a la presencia del complejo *E. histolytica/E. dispar*. Por otro lado, este complejo mostró asociación significativa con la presencia de *Blastocystis hominis*. En conclusión, la técnica de PCR demostró ser útil en la diferenciación de estas dos especies, además de evidenciar infecciones por *E. dispar* en individuos tanto sintomáticos como asintomáticos.

INTRODUCCIÓN

El término amibiasis incluye todos los casos humanos de infección por *Entamoeba histolytica*, entendiéndose como infección la simple interacción hospedero-parásito y no necesariamente la presencia de alteraciones patológicas (Sepúlveda y Tremiño, 1989).

Entamoeba histolytica fue descubierta por Lösch en 1875 (citado por Reyes y León, 2002) en las heces disentéricas de un campesino, reproduciendo la infección del individuo en perros, evidenciando relación causa-efecto entre la presencia del microorganismo, las alteraciones anatomopatológicas y las manifestaciones clínicas de la disentería. Más tarde Quincke y Roos (1893) descubren la forma quística de la amiba y su papel en la diseminación de la infección; y no es sino hasta 1925 cuando Emile Brump basándose en observaciones clínicas, epidemiológicas y en estudios experimentales en gatos, señaló la existencia de *E. histolytica* como un complejo de dos especies a las que denominó *Entamoeba dysenteriae*, causante de la infección sintomática y *Entamoeba dispar* encontrada en personas sanas (Brump, 1925; Chacín, 2001; Reyes y León, 2002).

En 1978, luego de varios años de investigación, Sargeant y Williams lograron por primera vez, diferenciar por medio de estudios electroforéticos de isoenzimas, cepas de *E. histolytica* aisladas de pacientes con manifestaciones clínicas de amibiasis y portadores asintomáticos, confirmándose que *E. histolytica* está constituida por cepas patógenas y no patógenas. De esta manera se describieron diferentes zimodemos de *E. histolytica*, definiéndose zimodemos como poblaciones de amebas que difieren entre sí en la movilidad electroforética de ciertas enzimas. Así, se estableció un marcador de patogenicidad dado por la presencia de banda β en ausencia de banda α en la enzima fosfoglucomutasa. Se han descrito 24 patrones de

zimodemos a partir de 6 000 cepas de *E. histolytica*, aislados de diferentes partes del mundo durante un periodo de 10 años, de los cuales se describieron 12 patógenos y 12 no patógenos al correlacionar la presentación clínica, el análisis de zimodemos y la serología (Sargeaunt y cols., 1984; Sargeaunt y cols., 1985; Sargeaunt y cols., 1987; Nozaki y cols., 1990).

Por su parte, Petri y cols. (1987) lograron demostrar, mediante electroforesis con un grupo de sueros inmunes humanos, que la proteína de 170 kDa con mayor antigenicidad correspondía a la GAL/Gal Lectina. Braga y cols. (1992) demostraron la similitud entre la lectina de adherencia y la proteína CD59 de las células sanguíneas, por lo que *E. histolytica* evade la lisis inducida por complemento. Luego, estudios con técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales demostraron la diferencia de los antígenos de superficie entre las dos especies (Petri y cols., 1990; Haque y cols., 1993). Tannich y cols. (1989) identificaron las diferencias genéticas entre las cepas patógenas y no patógenas. Este conjunto de trabajos sobre aspectos funcionales, bioquímicos, inmunológicos y genéticos de aislamientos de amibas procedentes de individuos con o sin manifestaciones clínicas, contribuyeron a la acumulación de pruebas definitivas a favor de la existencia de dos especies, redescubriendo formalmente a *E. histolytica* separándola de *E. dispar* (Sargeaunt y cols., 1978; Strachan y cols., 1988; Tannich y cols., 1989; Diamond y Clark, 1993; Pinilla y cols., 2008).

Entamoeba histolytica y *Entamoeba dispar* constituyen un grupo de protozoos pertenecientes al phylum Sarcomastigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, familia Endamoebidae, género *Entamoeba*, especie *E. histolytica* y *E. dispar* (Chester y cols., 1992). Sin embargo, el género *Entamoeba* comprende un grupo de especies en las cuales seis de ellas pueden encontrarse en el intestino del hombre (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli* y *Entamoeba*

hartmanni). De estas sólo *E. histolytica* es patógena y causa la amibiasis intestinal, enfermedad que se presenta en un 10% de la población mundial (Fonte, 2000).

En cuanto a su morfología estas amibas son microorganismos de aparente simplicidad estructural, su ciclo vital presenta dos formas evolutivas: trofozoítos y quistes. Los trofozoítos miden de 10-50 µm de diámetro, presentan pleomorfismo y tallas variadas de acuerdo a la actividad del parásito, hallando trofozoítos más pleomórficos y de mayor talla en heces disentéricas en comparación a los encontrados en heces no disentéricas. Además, presentan citoplasma diferenciado en ectoplasma y endoplasma muy vacuolado donde se destaca un núcleo con cromatina distribuida por la parte interna de la membrana nuclear, cariosoma central, pequeño y compacto, éste es afectado por cambios de temperatura, pH y de osmolaridad; la presencia de eritrocitos entre los elementos fagocitados es característica de *E. histolytica*. Los quistes miden de 10-18 µm de diámetro, poseen de uno a cuatro núcleos esféricos, con cariosoma central, son resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden permanecer viables en la materia fecal o expuestos al medio ambiente hasta ocho días a temperaturas de 28 a 34°C o hasta por un mes a 10°C. Los individuos infectados pueden excretar hasta 45 000 000 de quistes al día (Cabrera, 1999).

La infección por *E. histolytica* y/o *E. dispar* es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes tetranucleados, los cuales resisten el pH ácido del estómago del hospedero, ocurriendo el desenquistamiento en el intestino delgado, 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. Estos trofozoítos llegan al intestino grueso en donde se alimentan de bacterias y otras células en contacto con su superficie, aumentando de tamaño y alcanzando las dimensiones definitivas de los trofozoítos maduros de la especie. En el intestino grueso los trofozoítos amibianos continúan multiplicándose por división binaria y en

el caso de *E. histolytica* en ciertas circunstancias pueden invadir la pared de esta víscera e incluso, hacer migraciones a órganos y tejidos distantes. Sin embargo, los trofozoítos de *E. histolytica* y/o *E. dispar* en condiciones adversas eliminan sus vacuolas alimenticias, condensándose en una masa esférica que viene a ser el prequiste. Posteriormente, esta célula se cubre de pared protectora y se convierte en un quiste inmaduro que sólo posee un núcleo. Dos divisiones nucleares sucesivas originan finalmente el quiste tetranucleado (Pumarola y cols., 1991; Rashidul y cols., 2005).

El estado de portador asintomático es un cuadro clínico frecuente, estos individuos aunque están infectados por *E. histolytica* permanecen libres de síntomas y en estos casos la infección se encuentra limitada exclusivamente a la luz del colon y no se produce invasión del mismo (Matijasevic, 1989).

Existen múltiples factores responsables de que en unos casos la infección amibiana sea asintomática, mientras que en otros llega incluso a amenazar la vida del hospedero. Dentro de estos factores se encuentran los dependientes del parásito como lo es la patogenicidad, que en el caso de *E. histolytica* aún no se conoce si es un rasgo genéticamente determinado que se manifiesta de manera invariable en las cepas en las que se encuentra presente o si se trata de un rasgo genético presente en el genoma de todas las cepas, cuya manifestación fenotípica puede ser activada por diversos factores del hospedero o del medio ambiente (Matijasevic, 1989).

Con respecto al hospedero son muchos los factores que desde el punto de vista epidemiológico parecen favorecer la aparición de amibiasis invasora como la edad, el sexo, el estado nutricional, el alcoholismo, las infecciones por otros parásitos y la acción sinérgica de la flora bacteriana intestinal (Matijasevic, 1989). En infecciones sintomáticas producidas por esta especie patógena, se conocen cuatro formas clínicas a nivel intestinal dentro de las cuales se mencionan: la amibiasis disintérica también

conocida como colitis amibiana, ocurren en el 90% de los casos, la clínica dura aproximadamente un mes con síntomas de diarreas. Otras patologías menos frecuentes son la colitis fulminante, la apendicitis amibiana y el ameboma del colon (Raj y Upcroft, 2001).

En relación a el diagnóstico de las infecciones por *E. histolytica*, ha dependido del estudio de los síntomas clínicos del paciente. El diagnóstico coprológico se establece por la observación de las diferentes formas evolutivas del parásito en las heces de los pacientes, sin embargo, hay que tener presente que sólo en pocos casos es posible encontrar trofozoítos en las heces, por lo que las muestras deben ser analizadas de forma inmediata, ya que su demora ocasiona la transformación y desintegración de los mismos. A pesar de que este procedimiento es el método frecuentemente empleado por ser rápido, sencillo y económico, la subjetividad inherente a los exámenes de materia fecal, errores propios de la recolección, concentración, tinción de las muestras y tomando en cuenta que ambas especies son morfológicamente idénticas y que presentan similitud con las células del hospedero como leucocitos y macrófagos, y además la pericia del observador, limitan demasiado la utilidad del diagnóstico coprológico (Yau y cols., 2001).

Sólo hasta 1997, la OMS reglamentó reportar el complejo *E. histolytica* *E. dispar*, en presencia de quistes y *E. histolytica* en presencia de trofozoítos hematófagos, sin embargo, se recomendó que idealmente *E. histolytica* debe ser identificada y tratada, si sólo se identifica *E. dispar* el tratamiento no es necesario y si el paciente tiene síntomas gastrointestinales se deben buscar otras causas; en individuos asintomáticos no se recomienda tratamiento cuando se identifica el complejo de *E. histolytica*/*E. dispar* a menos que haya sospecha de infección con *E. histolytica*, las razones para sospechar infección incluyen títulos de anticuerpos específicos altos, historia de contacto estrecho con un caso de amibiasis invasiva o un brote; en presencia del complejo, en un paciente sintomático, no se debe asumir que

sea *E. histolytica* sino deben ser consideradas otras causas; estas recomendaciones son adecuadas para todos los individuos (Who, 1997).

Por otro lado, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* son especies morfológicamente idénticas a *E. histolytica*, sin embargo, no se les ha demostrado patogenicidad, son diferenciables de la especie patógena mediante patrones isoenzimáticos y por determinación de adhesina en materia fecal o técnicas moleculares (Who, 1997; Pinilla y cols., 2008). Sin embargo, estas especies se han identificado en heces de pacientes sintomáticos, no descartando que dicha sintomatología sea causada por otros agentes patógenos.

Las coloraciones de hematoxilina férrica y tricrómica, son métodos empleados en el diagnóstico diferencial de las características nucleares y hematofagismo de *E. histolytica* con las otras especies de este género, sin embargo, al igual que la microscopia convencional no permite la diferenciación de las especies cuando sólo se observen los quistes y trofozoítos no hematófagos. Por ello resulta indispensable la aplicación de métodos más sensibles que permitan diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Por su parte, los métodos inmunológicos no permiten diferenciar entre infecciones agudas, crónicas y aquellas previamente tratadas, debido a que los anticuerpos permanecen en suero por años después de la infección amibiana y en los casos asintomáticos de cepas no patógenas, las pruebas serológicas son siempre negativas dado que en estos casos los trofozoítos no han tenido contacto con la mucosa, ni la han invadido, por lo tanto no se desarrollan anticuerpos (Braga y cols., 1996; Gutierrez-Kobe y cols., 1997; Willhoef y cols., 1999).

Shanta y cols. (1998) señalaron la técnica de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) como un método útil en el diagnóstico de amibiasis extraintestinal, donde se ha demostrado que más del 80% de los pacientes dan serología positiva, sobre todo en aquellos casos donde los parásitos no son observables a través de las heces.

Actualmente, el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hace posible amplificar el ADN amibiano presente en la materia fecal y está siendo ampliamente utilizada en la diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* a partir del ADN extraído de las heces, resultando de gran utilidad para estudios epidemiológicos y para la detección de infecciones mixtas de *E. histolytica* y *E. dispar* (Katzwinkel y cols., 1994; Huston y Petri, 1999). Esta técnica es considerada como la prueba de elección en la detección e identificación de *E. histolytica* y *E. dispar* por ser un método altamente sensible, específico, fácilmente reproducible y rápido, reemplazando por ende los cultivos y los análisis isoenzimáticos en estas especies, y lo más resaltante es que el diagnóstico molecular minimiza la aplicación de tratamientos inadecuados en infecciones por otras especies no patógenas del género de *Entamoeba* (Tanyuksel y Petri, 2003; Fotedar y cols., 2007).

E. histolytica es un protozoo de distribución mundial, que afecta en particular a países en vía de desarrollo, infecta alrededor de 500 millones de personas y anualmente 110 000 mueren por complicaciones. Así, la amibiasis es considerada la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial después de la malaria y la esquistosomiasis. Las personas infectadas se dividen en dos grupos de acuerdo a sus manifestaciones clínicas: 90% son asintomáticos (portadores sanos) y 10% son sintomáticos principalmente a nivel intestinal (disentería amibiana, rectocolitis aguda, colitis no disintérica crónica, ameboma) y extraintestinal (absceso hepático amibiano, absceso cerebral, enfermedad genitourinaria y cutánea). Sin embargo, 1% de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como colitis amebiana fulminante (Walsh y Warren, 1979; Pinilla y cols., 2008). Por otro lado, la aceptación de *E. dispar* como una especie de protozoario distinto, pero estrechamente relacionado con *E. histolytica* ha tenido implicaciones profundas para la epidemiología de la amibiasis (Urdaneta y cols., 1998; Rivera y cols., 1998; Haque y cols., 1999a; Raj y Upcroft, 2001; Simonetta y cols., 2002).

Al respecto, en Venezuela, Chacin y cols. (1990) reportaron porcentajes de la infección por las especies *E. histolytica* y/o *E. dispar* los cuales varían de 6,8 a 42%, distribuidos de 1,8 a 29,5% para las áreas urbanas y hasta 20% en poblaciones rurales; para el año 1983 se encontró un gran número de casos de amibiasis en los estados Lara, Distrito Federal, Mérida, Cojedes, Sucre, Zulia, Trujillo y Falcón (Homéz y cols., 1995). Por otra parte, el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social notificó 100 948 casos de amibiasis durante 1996, siendo el estado Zulia con 22 722 casos, el que registró la mayor morbilidad; seguido por Falcón con 7 301, Táchira con 6 736, Lara con 6 658 y Aragua con 5 476 casos (Navarro y Reyes, 1999), y hasta la actualidad este complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* sigue ocupando prevalencias importantes en diferentes áreas de estudio en el país (Arenas-Pinto y cols., 2003; Miller y cols., 2003; Diaz y cols., 2006).

Las investigaciones realizadas sobre este patógeno intestinal han permitido el aislamiento y axenización de aislados clínicos de *E. histolytica*, permitiendo realizar estudios de zimodemos, virulencia de las cepas, entre otros (Urdaneta y cols., 1995). Además, se han realizado estudios de test inmunoenzimáticos en muestras fecales mostrando que el COPROELISA-Eh presentó una sensibilidad de 94,4%, especificidad 98,3%, valor predictivo positivo 96,2% y valor predictivo negativo 97,6% para la detección de *E. histolytica* en heces, demostrando que este método fue más sensible y específico que el diagnóstico microscópico, que no requiere de personal entrenado y que permite el análisis de un gran número de muestras simultáneamente (Urdaneta y cols., 1996).

Por otro lado, con respecto a la aplicación de métodos moleculares, Aguirre y cols. (1997) caracterizaron dos cepas venezolanas de *E. histolytica* usando patrones electroforéticos de isoenzimas y PCR-SHELA; mientras que con respecto al uso de estas metodologías moleculares en el diagnóstico clínico, Michelli (2004), en un estudio llevado a cabo en dos poblaciones rurales del estado Sucre (Caituco y Llanada

de Cangua), mediante el diagnóstico molecular de patógenos intestinales relacionados con cuadros diarreicos disentéricos, no encontró infecciones por *E. histolytica* ni *E. dispar*.

Mora y cols. (2005), en pacientes con sintomatología gastrointestinal de diarrea en el estado Sucre, mediante la aplicación del examen directo, método de concentración Ritchie y coloración tricrómica, registró una prevalencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* del 16,0% ubicándose el mayor número de infectados entre 10-19 años.

Posteriormente, Mora (2006) en un estudio realizado en Cumaná, estado Sucre en 428 pacientes con cuadros diarreicos, encontró 23 casos de infecciones por *E. histolytica*, 15 de *E. dispar* y 4 de infecciones mixtas usando la PCR; demostrándose que ambas especies circulan en esta población, a diferencia de los resultados obtenidos al aplicar el examen microscópico el cual reflejó que 83 pacientes resultaron con infecciones por el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

La redescrición de *E. histolytica* con respecto a *E. dispar* reconociéndola como patógena y comensal, respectivamente, ha cambiado claramente la visión en el enfoque del cuadro clínico, el diagnóstico y el tratamiento. *E. dispar* es más común en la población mundial, lo que ya ha sido informado en algunos países, por lo tanto la infección por *E. histolytica* debe ser realmente menos frecuente. A pesar de todos los avances, actualmente el diagnóstico de laboratorio de uso cotidiano es el examen de materia fecal al microscopio, el cual requiere de personal entrenado. Por ende, se requieren métodos más precisos, rápidos y económicos asequibles para el clínico, debido a las implicaciones que tiene el diagnóstico oportuno y exacto de las especies del género *Entamoeba* presentes en cuadros clínicos intestinales de individuos sintomáticos y asintomáticos.

En este sentido, la aplicación de métodos moleculares que tienen mayor sensibilidad y que no están sujetos a la experiencia del personal que realiza el diagnóstico, contribuye a la detección e identificación de la especie patógena para realizar el tratamiento adecuado, y además permite evaluar la población asintomática que tiene gran valor epidemiológico, por que constituye la fuente de infección con estas especies y contribuye a la diseminación de las mismas. Además, la PCR contribuye al conocimiento epidemiológico del número 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, por lo que el objetivo general de esta investigación consistió en evaluar la frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

METODOLOGÍA

Población

Para este estudio se tomó una muestra representativa del laboratorio del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” y los ambulatorios: Dr. “Bernardino Martínez” y Dr. “Ramón Martínez” de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. El tamaño de la muestra en ésta investigación estuvo conformada por 317 individuos de todas las edades y ambos sexos con o sin sintomatología clínica, siguiendo las recomendaciones propuestas por Cochran (1985), cuya fórmula es:

$$n = \frac{K^2 \times N \times PQ}{(e^2 \times N) + (K^2 \times PQ)}$$

Donde:

K= 1,96 nivel de confiabilidad

P= 0,50 probabilidad de aceptación

e= 0,06 error de estudio

Q= 0,50 probabilidad de rechazo

N= tamaño de la población

Se excluyeron en este estudio, todos aquellos individuos que habían recibido tratamiento antiparasitario quince días antes de la colecta de las muestras. Para la realización de esta investigación se suministró información sobre el estudio a todos los individuos evaluados, utilizando para ello un consentimiento previa información (CPI) contemplado en el Código de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCT) y Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACIT) para la recolección de muestras de heces en humanos. En

el caso de los niños, se contó con la autorización de los padres (Anexos I, II y III). A cada uno de los individuos se les realizó una encuesta epidemiológica, donde se obtuvo información sobre las características personales y clínicas (Anexo IV), siguiendo los lineamientos de Helsinki del año 2000. Las muestras recolectadas fueron trasladadas de inmediato al laboratorio de Especialidades Parasitológicas del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Procesamiento de las muestras

Diagnóstico coproparasitológico

Estudio macroscópico: se observaron las características físicas de la muestra como aspecto, consistencia, color, olor, pH, presencia o ausencia de moco, sangre y vermes adultos (Botero y Restrepo, 1998).

Estudio microscópico: la búsqueda de las formas parasitarias se realizó por métodos directos basados en preparaciones húmedas, con solución salina fisiológica al 0,85% y coloración de lugol, que se observaron al microscopio con los objetivos de 10X y 40X. Se procedió a la identificación de las formas parasitarias encontradas. También se utilizó la coloración de Quensel, la cual permitió diferenciar las amibas de algunas células del hospedero. Para ello, se realizó una preparación húmeda entre lámina y laminilla, la cual fue observada a los 10 min de haber sido preparada (Botero y Restrepo, 1998).

Coloración tricrómica: esta técnica permitió la tinción de los protozoarios intestinales para la observación de la morfología nuclear de las amibas. Para ello se procedió a la realización de los frotis fecales, se fijaron con alcohol polivinílico (PVA) por 1h a temperatura ambiente, se colocó 1 min en alcohol yodado y se pasaron dos veces por etanol al 70% por 1 min. La coloración se hizo con la solución

tricromica por 5 min y la decoloración se realizó pasando la lámina por alcohol acidificado al 90% 15 s, se lavó el frotis con agua, se deshidrató 2 veces con etanol al 95%, por último, se pasó la lámina por xilol 1 min y, se realizó el montaje con bálsamo de Canadá, observándose las láminas con objetivo de inmersión 100X (Pumarola y cols., 1991).

Diagnóstico molecular

Extracción de ADN: se realizó directamente a las muestras de heces, utilizando un kit de extracción Wizard Genomic[®] de Promega (Madison, Wisconsin, EUA).

Procedimiento: todas las muestras observadas al examen coproparasitológico con presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*, fueron sometidas a la extracción de ADN, para la cual se colocó aproximadamente 1 g de heces en tubos Eppendorf, se le agrego 800 µl de buffer fosfato PBS (NaCl 137 mmol/l; KCl 2,7 mmol/l; Na₂HPO₄ 10 mmol/l; KH₂PO₄ 2 mmol/l) a una concentración 1X y a pH 7,4; se mezcló y centrifugó por 3 min a 14 000 g, posteriormente se decantó el sobrenadante y se repitió este lavado por 3 veces. Se agrego 20 µl de proteinasa K y fueron incubadas por 2 horas a 65°C. Se centrifugaron por 2 min a 14 000 g y a 18°C, se descartó el sobrenadante, se agitó y se procedió a la extracción de ADN, resuspendiendo en 600 µl de la solución de lisis de núcleo por pipeteo y se mezcló, la cubierta de los quistes fue fracturada por enfriamiento en nitrógeno líquido y calentamiento en agua a 95°C, repitiendo 3-4 veces. Se dejaron a temperatura ambiente por 10 s, se añadió 200 µl de solución precipitante de proteínas; se agitó en vórtex por 20s. Posteriormente, la muestra fue enfriada en hielo por 5 min y se centrifugó por 5 min a 13 000-16 000 g a 4°C. Se removió el sobrenadante que contenía el ADN y se transfirió a tubos que contenían 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución por inversión. Se centrifugó por 25 min a 13 000-16 000 g a 4°C. El ADN quedó en el sedimento formando un pequeño

precipitado blanco. El sobrenadante se decantó y se adicionó 600 µl de etanol al 70 % a temperatura ambiente mezclándose suavemente por inversión varias veces para lavar el ADN. Se centrifugó por 5 min a 13 000-16 000 g a 4°C. Se aspiró el etanol usando una micropipeta. Se invirtió el tubo sobre un papel absorbente y se dejó secar por 10-20 min. Se adicionó 50 µl de solución rehidratante para el ADN y se dejó por toda la noche a temperatura ambiente. El ADN se almacenó a -20°C, hasta su posterior uso para la PCR (Miller y cols., 1988; Evangelopoulos y cols., 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa está basada en la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN del parásito. Se realiza en tres etapas: La desnaturalización del ADN doble cadena, hibridación de los cebadores a la zona 5' específica de cada una de las hebras, y extensión del cebador por síntesis. En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 5' complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar a la temperatura (50-65°C). Finalmente, en la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' > 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Schnell y Mendoza, 1997).

La amplificación de los fragmentos de ADN específicos para las especies se llevó a cabo por Nested-Multiplex PCR, donde se amplificó primero un fragmento de ADN ribosomal (ADNr) común para ambas especies y posteriormente, se amplificaron los fragmentos específicos, utilizando los cebadores respectivos para cada especie que amplifican un fragmento del ADN ribosomal 16S (Evangelopoulos

y cols., 2000).

Para la optimización de la PCR se utilizó ADN de 2 cepas controles para *E. histolytica*, cepa IULA: 0593:2 (NER) procedente de Mérida-Venezuela y la cepa UDO402 como control de *E. dispar*.

Primera reacción

Para la primera reacción de PCR se utilizaron los cebadores externos E1 (TGC TGT GAT TAA AAC GCT) y E2 (TTA ACT ATT TCA ATC TCG G), que amplificaron un fragmento de 1076 pb común en ambas especies de *Entamoeba* (Evangelopoulos y cols., 2000). Para cada amplificación se prepararon 25 µl de mezcla de reacción en tubos de PCR de 0,2 ml cuyos componentes fueron: 2 µl de ADN para cada ensayo, 2,5 µl de buffer 10X de PCR (200 mmol/l Tris-HCl, pH 8,4; 500 mmol/l KCl), 0,2 mmol/l de cada nucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,5 µmol/l de cada cebador, 1,5 mmol/l de cloruro de magnesio (MgCl₂) y 1,25 U *Taq* polimerasa (Promega).

Todas las muestras fueron corridas en un termociclador TECHNE (TC-512) utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 5 min, para la desnaturalización inicial; 45 ciclos a 94°C por 1 min, para la desnaturalización; 1 ciclo a 45°C por 1,5 min, para la hibridación; 1 ciclo a 72°C por 2,5 min, para la extensión; 1 ciclo a 72°C por 10 min, para la extensión final.

Segunda reacción

Luego se procedió a una segunda amplificación utilizando los cebadores internos específicos para cada una de las especies. Los cebadores internos específicos para *E. histolytica* Eh-L (ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A) y Eh-R (CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT) fueron utilizados para amplificar un

fragmento de 427-pb, mientras que los cebadores internos específicos para *E. dispar* Ed-L (GTT AGT TAT ATA ATT TCG ATT AGA A) y Ed-R (ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC) fueron usados para amplificar un fragmento de 195-pb (Evangelopoulos y cols., 2000). La amplificación se realizó de la misma manera a la descrita, pero con una temperatura de 58°C para la hibridación y utilizando 5 µl del producto de la primera amplificación (Sommer y Tautz, 1989).

Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo) en gel de agarosa al 2 % coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando fórmulas de frecuencia para reflejar la aparición de las especies en estudio, y la asociación de la sintomatología con los parasitados por *E. histolytica* se realizó a través del análisis de regresión logística binaria y la prueba de Kappa (Morales y Pino, 1995).

RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron 317 individuos de diferentes grupos etarios y ambos sexos, a los cuales se les realizó diagnóstico coproparasitológico convencional. El método de diagnóstico directo de las heces permitió detectar 197 (62,14%) individuos infectados con protozoarios y helmintos intestinales (Tabla 1). Encontrando predominio de infecciones producidas por protozoarios intestinales, en comparación con la baja frecuencia de helmintiasis diagnosticadas. Dentro de los protozoarios la mayor frecuencia la mostró *Blastocystis hominis* (47,00%), seguido de *Endolimax nana* (9,78%), *Giardia duodenalis* (9,15%), *Entamoeba coli* (8,20%) y el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* (6,94%). Es importante resaltar que la mayoría de las infecciones producidas por estos protozoarios intestinales fueron encontradas con variada frecuencia en el grupo de individuos asintomáticos (Tabla 1).

Con respecto al diagnóstico del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*, sólo se identificaron formas quísticas de estas amibas, incluso en los individuos sintomáticos y la detección de estas formas evolutivas varió dependiendo del método de diagnóstico utilizado. El total de los individuos infectados por el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* (6,94%) fueron detectados al practicar el examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol, mientras que el tricrómico permitió el diagnóstico en un 3,15 %. En las muestras analizadas coloreadas con lugol y quensel en las formas quísticas se observó muy débilmente el cariosoma central y el tricrómico presentó una coloración muy clara (Figura 1). La presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* presentó mayor frecuencia en los individuos sintomáticos (90,9%), corroborándose por tricrómico un 36,4% de las mismas (Tabla 2).

Al determinar y relacionar la presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* con la de otros parásitos intestinales observados por metodología convencional (examen directo), se obtuvo asociación significativa con *B. hominis* (Tabla 3).

En los individuos en quienes se diagnosticó la forma quística del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* por método directo, se les realizó la extracción de ADN genómico directamente a las muestras fecales, donde se observaron las bandas características (Figura 2), según el patrón del marcador de peso molecular de 1 Kb utilizado en la corrida electroforética. Sin embargo, en algunas muestras el ADN genómico se presentó degradado (Figura 2A), lo cual es de esperarse debido a la naturaleza de las muestras, ya que contienen gran cantidad de contaminantes que pueden degradar los ácidos nucleicos.

Tabla 1 Frecuencia de protozoarios y helmintos intestinales identificados por examen directo de las heces de individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Especies de parásitos	Individuos			
	Sintomáticos		Asintomáticos	
	Nº	%	Nº	%
Protozoarios				
<i>Blastocystis hominis</i>	19	5,99	130	41,01
<i>Endolimax nana</i>	5	1,58	26	8,20
<i>Giardia duodenalis</i>	2	0,63	27	8,52
<i>Entamoeba coli</i>	1	0,31	25	7,89
<i>E. histolytica</i> y/o <i>E. dispar</i>	20	6,31	2	0,63
<i>Chilomastix mesnili</i>	3	0,95	6	1,89
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	0,31	7	2,21
Helmintos				
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3	0,95	8	2,52
<i>Trichuris trichiura</i>	0	0,00	3	0,95
Anquilostomídeos	0	0,00	3	0,95
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0,00	1	0,31
Negativos	31	17,03	89	75,08

Al analizar las muestras por Nested-Multiplex PCR, sólo se obtuvo amplificación en 7 de las muestras diagnosticadas por el examen directo. En la primera ronda de amplificación se debió observar fragmentos amplificados de 1 076 pares de bases (pb) comunes para el género *Entamoeba* (Figura 3), sin embargo, no se observó dicho fragmento, posiblemente debido a la baja carga parasitaria de las muestras analizadas o a la falta de condiciones óptimas para esta reacción, como la presencia de inhibidores.

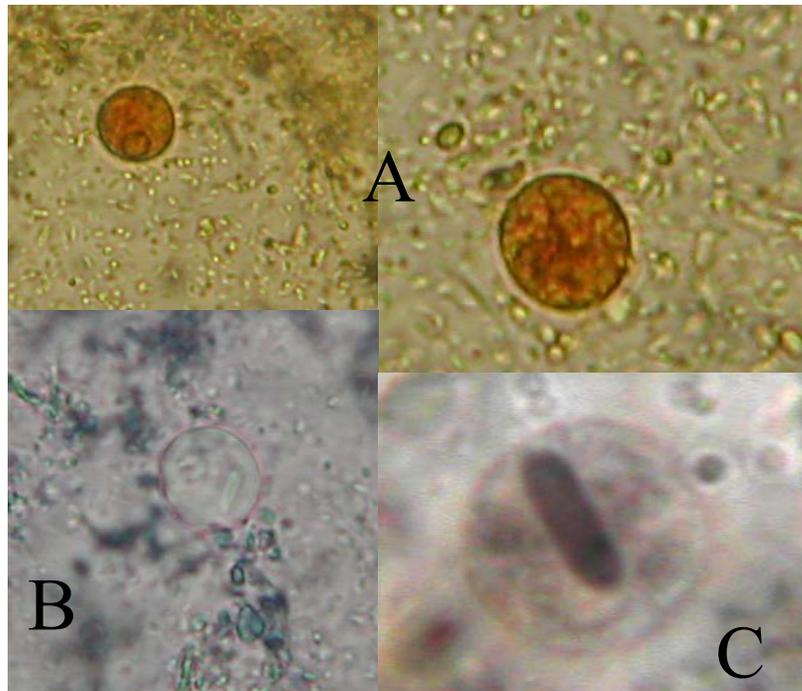


Figura 1. Fotomicrografía de *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar*. Quistes coloreados con solución de lugol (A). Quiste inmaduro de *E. histolytica* y/o *E. dispar* en solución de Quensel donde se observa el cuerpo cromatoide (B). Quiste inmaduro de *E. histolytica* y/o *E. dispar* coloreado con solución tricrómica donde se observa el cuerpo cromatoide (C).

A pesar de que en la primera ronda no se obtuvo amplificado, la segunda ronda de Nested-Multiplex-PCR permitió identificar especies en las 7 muestras amplificadas. Un fragmento de 427 pb específico para *E. histolytica* permitió la detección e identificación de 4 infecciones por esta especie y uno de 195 pb específico para *E. dispar* identificó 3 infecciones con ésta.

Tabla 2. Frecuencia de *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar* por métodos parasitológicos en individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Especies parasitarias	Métodos parasitológicos							
	Directo				Tricrómico			
	Sintomático		Asintomático		Sintomático		Asintomático	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>E. histolytica</i> y/o <i>E. dispar</i>	20	90,9	2	9,01	8	36,4	2	9,01

Tabla 3. Resultados del análisis de la asociación por regresión logística binaria y prueba de Kappa entre el diagnóstico microscópico del complejo *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar* con la presencia de otros parásitos.

Parásitos	P	P-Kappa	OR *
<i>Blastocystis hominis</i>	0,004	0,001	6,2
<i>Giardia duodenalis</i>	0,449	0,438	-
<i>Endolimax nana</i>	0,707	0,109	-
<i>Entamoeba coli</i>	0,732	0,146	-
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0,757	0,357	-

* Proporción de probabilidad u “odds ratio”.

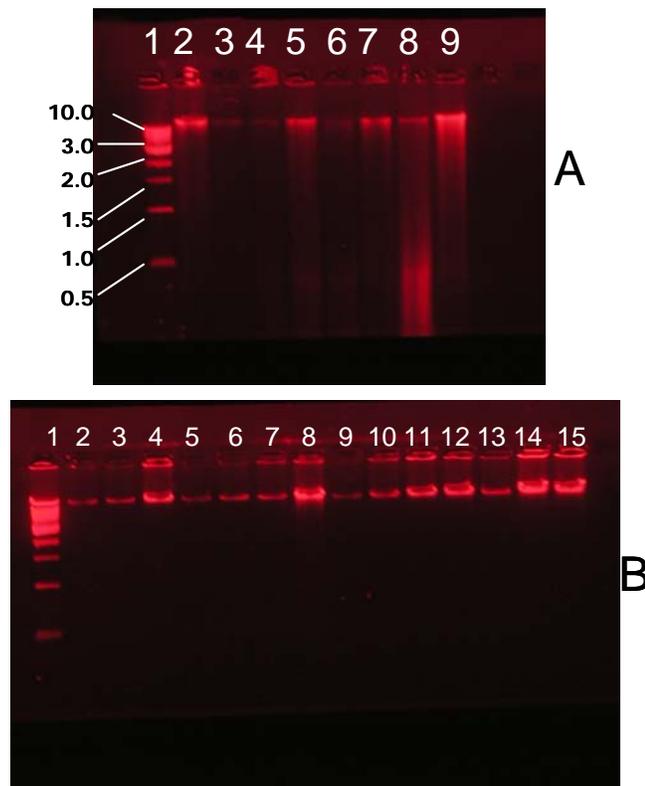


Figura 2. Extracción de ADN genómico a partir de muestras fecales ADN obtenido de las muestras evaluadas donde se observa degradación del mismo (pozos 2-9) B) ADN sin degradación (pozos 2-15), marcador de peso molecular de 1 Kb (pozo 1 figura 2A y B). Gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio (0,5µg/mL).

La frecuencia de *E. histolytica* fue ligeramente mayor a la encontrada por *E. dispar*, de acuerdo al diagnóstico molecular, tal como se muestra en la Tabla 4. No obstante, la marcada diferencia de frecuencia entre los métodos coproparasitológicos y el molecular para *E. histolytica* y *E. dispar*, podría ser debida a la presencia de otras especies del género *Entamoeba* morfológicamente idénticas a estas y que

pueden infectar al hombre, para lo cual tendrían que usarse otros cebadores que permitan identificar las otras especies en estas muestras analizadas.

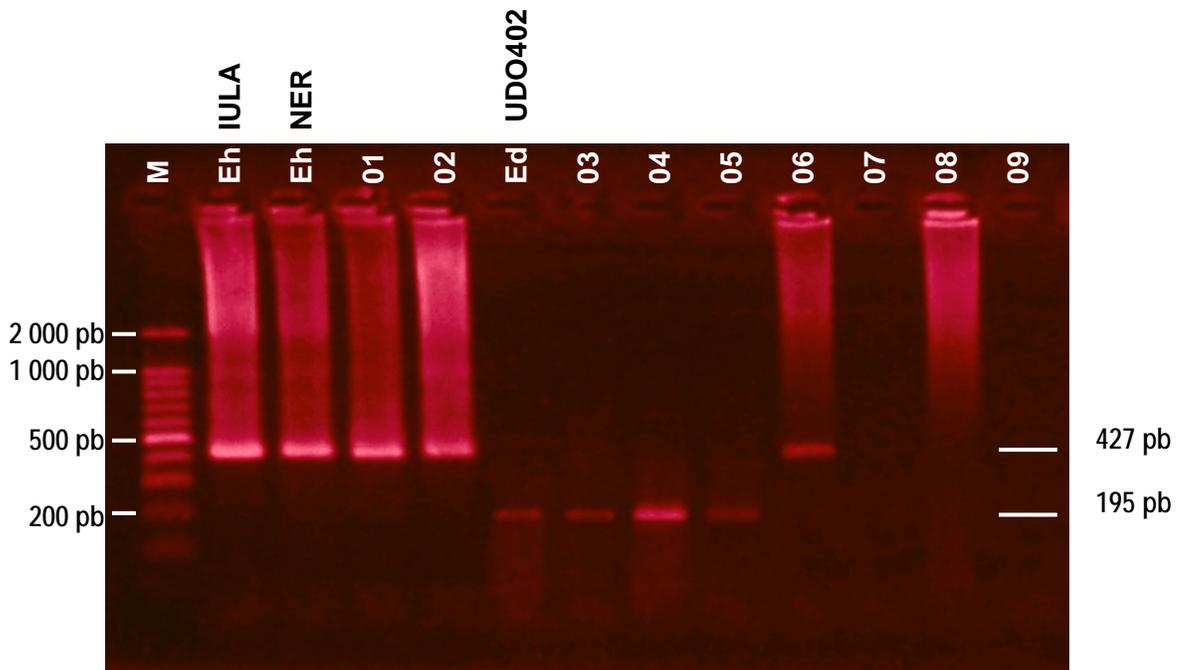


Figura 3. Productos amplificados por nested-multiplex PCR del gen de ARN ribosomal que amplifica un fragmento mayor específico de *Entamoeba histolytica* y uno menor específico de *Entamoeba dispar*. EhIULA, EhNER y EdUDO402 son controles positivos para cada especie y M: marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Números 01-06 muestras positivas y 07-08 muestras negativas, 09 control negativo.

Por otro lado, sólo se identificó *E. histolytica* en individuos sintomáticos, mientras que los infectados por *E. dispar* dos presentaron síntomas y uno no, en este caso es importante señalar que la presencia de estos síntomas no deben ser atribuidos exclusivamente a *E. dispar* debido a que otros agentes patógenos pueden ocasionarlos (Tabla 4).

Al evaluar los signos y síntomas clínicos con la presencia de *E. histolytica*, se observó la presencia de sangre y moco en las muestras, además los infectados por el parásito presentaron dolor abdominal, náuseas, vómitos y en el menor de los casos fiebre, en cambio dos de los infectados por *E. dispar* presentaron moco pero no se evidenció la presencia de sangre (Tabla 5).

Tabla 4. Frecuencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* a través del método molecular en individuos sintomáticos y asintomáticos provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Especies parasitarias	Nested- multiplex PCR				Total	
	Sintomático		Asintomático		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
<i>E. histolytica</i>	4	18,2	0	0,00	4	18,20
<i>E. dispar</i>	2	9,01	1	4,54	3	13,55

Con respecto a los resultados obtenidos al evaluar las variables clínicas con la presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* diagnosticadas por observación microscópica, se encontró asociación significativa con la presencia de moco, náuseas, además de dolor abdominal y vómitos; las demás variables resultaron no estar asociadas con la presencia del complejo (Tabla 6).

No se pudo asociar las variable clínicas evaluadas con *E. histolytica*, ya que el número de muestras positivas fue muy pequeño para cualquier análisis estadístico.

Tabla 5. Frecuencia de signos y síntomas clínicos en individuos infectados por *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* diagnosticados por Nested-multiplex PCR.

Signos y síntomas	<i>E. histolytica</i>		<i>E. dispar</i>	
	Nº	%	Nº	%
Moco	4	100	2	66,00
Sangre	4	100	0	0,00
Vómitos	3	75	0	0,00
Náuseas	4	100	1	33,33
Dolor abdominal	4	100	1	33,33
Fiebre	2	50	0	0,00

Tabla 6. Resultados del análisis de la asociación por regresión logística binaria entre el diagnóstico microscópico del complejo *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar* con las variables clínicas y epidemiológicas.

Variable	P	OR *
Vómitos	<0,001	19,7
Dolor Abdominal	<0,001	38,1
Náuseas	<0,001	17,4
Moco	<0,001	71,5

*Proporción de probabilidad u “odds ratio”.

DISCUSIÓN

Se conoce que las infecciones parasitarias tanto por helmintos como por protozoarios constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en humanos, y son consideradas enfermedades medio ambientales debido a que los factores ecológicos juegan un importante papel en la supervivencia, desarrollo, distribución, y transmisión de formas infectantes de los parásitos, además estas infecciones están estrechamente vinculadas con las deficientes condiciones socioeconómicas y culturales, así como también inadecuados hábitos higiénicos (Basualdo y cols., 2007). En este sentido, esta investigación demuestra la continua exposición de la población evaluada a diferentes fuentes de contaminación de enteroparásitos, con ello se evidencia la permanencia y difusión de las formas evolutivas infectantes de los mismos. Por su parte, Michelli y De Donato (2001), en una comunidad de Río Caribe, al evaluar parasitosis intestinales, encontraron que de un total de 100 individuos analizados, el 75% de ellos estuvo parasitado por distintos helmintos y protozoarios, siendo mayoría los patógenos de este último grupo.

Dentro de los protozoarios patógenos *Entamoeba histolytica* ocasiona aproximadamente entre 40 a 50 millones de casos de colitis amibiana y absceso hepático, y es responsable de 100 000 muertes cada año (Haghighi y cols., 2003, Ali y cols., 2008). El establecimiento de la infección presenta gran variabilidad clínica, encontrándose desde cuadros asintomáticos hasta cuadros extraintestinales de abscesos hepáticos, debido al alto grado de heterogeneidad en la virulencia del parásito (Ankri y cols., 1999 y Flores y cols., 1997), por lo que la amibiasis hasta la actualidad continua siendo una parasitosis de gran impacto epidemiológico en países en vías de desarrollo.

Al respecto, el estudio de Díaz y cols. (2006) sobre prevalencia de parásitos intestinales en niños de la Sierra de Perijá, estado Zulia, Venezuela, demostró predominio de helmintiasis intestinales, pero el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* fue el tercer protozooario de mayor frecuencia con 21,9%. Estos resultados difieren de los encontrados en este estudio donde aunque predominaron las infecciones por protozoarios intestinales, se encontró al complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* como quinto diagnosticado, con una frecuencia menor (6,94%) en los individuos evaluados de la ciudad de Cumaná. Además, se encontró una alta frecuencia de *B. hominis* (47%), lo cual ha sido reportado en otras regiones del país con prevalencias hasta de un 66,7% (Devera y cols., 2003; Devera y cols., 2006; Blanco y cols., 2007; Devera y cols., 2007); de hecho, hoy en día es el protozooario de mayor prevalencia a nivel nacional e internacional (Barahona y cols., 2003; Mercado y cols., 2003; Basualdo y cols., 2007; Ozcakir y cols., 2007). Por otro lado, *B. hominis* estuvo asociado a la presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* en este trabajo de investigación, estas asociaciones pueden estar relacionadas a el hecho de que estos parásitos comparten la misma vía de transmisión oral-fecal, además que los individuos coinfectados pudieran tener similares factores de riesgos asociados con la adquisición de la infección. Lo que coincide con lo reportado por Goncalves y cols. (2007) quiénes encontraron la misma asociación con *B. hominis*, y mencionan que esto se deba a la alta prevalencia del mismo.

La identificación y diferenciación del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* en muestras clínicas por diagnóstico microscópico directo es impreciso en los casos donde no se observan trofozoítos hematófagos, por que ambas amibas son idénticas morfológicamente, además de que esta técnica posee una sensibilidad de 60% lo que origina resultados falsos positivos y sobreestimaciones por confusiones con macrófagos y especies no patógenas de *Entamoeba* (Krogstad y cols., 1978; Gathiram y Jackson, 1985; Stracham y cols., 1988; Diamond y Clark, 1993; González y cols., 1994; Haque y cols., 1997). Se ha demostrado que los cultivos de estas amibas son

técnicas sensibles para el diagnóstico de la amibiasis pero además de no permitir la diferenciación de especies, requieren de mayor trabajo, de procesamiento y tienen una duración de aproximadamente una semana para obtener resultados, y en muchos casos resultan negativos en muestras positivas por métodos parasitológicos convencionales (González y cols., 1994; Haque y cols., 1997; Stracham y cols., 1988).

Por otro lado, las coloraciones permanentes como la hematoxilina férrica y coloración tricrómica, se recomiendan para confirmar la identificación específica de la amiba, por que facilita el estudio de la morfología nuclear, lo que es de mucha importancia en el diagnóstico de estas infecciones (Hiatt y Ernest, 1995). Los núcleos de los trofozoítos amibianos son invisibles prácticamente en solución salina; y pueden deformarse considerablemente en solución de yodo, mientras que Tanyuksel y Petri, (2003) señalaron que una inadecuada coloración o fijación en caso de tricrómico no permite la diferenciación de la morfología nuclear de los quistes y trofozoítos de *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

La solución de Quensel se recomienda en preparaciones recién emitidas, ya que se pueden observar amibas móviles; pueden emplearse también con heces preservadas o sedimentos de cultivos. En este sentido, Guaimarás y Leme (1993), Mac Pherson y Mac Queen (1994) han considerado que la técnica de coloración con hematoxilina férrica es efectiva para el diagnóstico de *E. histolytica*, ya que se obtienen detalles morfológicos más precisos que permiten reconocer la especie. Sin embargo, cuando se sospecha de amibiasis se requiere realizar conjuntamente examen directo con solución salina al 0,85% y lugol, coloración de Quensel, coloración de hematoxilina férrica y cultivo en medio de Boeck y Drbohlav modificado, o por lo menos tres de estos métodos para lograr hacer la detección de la amiba (Pérez, 1993). Sánchez (1999), al analizar las técnicas coproparasitológicas empleadas para el diagnóstico de *E. histolytica* en la ciudad de Cumaná, reportó que de un total de 100

muestras fecales diarreas analizadas, el 10% fueron positivas al examen directo, 10% para Quensel, 7% para el cultivo y 11% para hematoxilina férrica, escogiendo la hematoxilina férrica como método de referencia por su mayor positividad en las muestras analizadas.

De igual forma, Jaimes (2004) al diagnosticar amibiasis en pacientes de diferentes centros asistenciales de Carúpano, estado Sucre, encontró que del total de muestras de heces procesadas, 51 (72,86%) fueron positivas al examen directo y 43 (61,43%) para la coloración tricrómica, 40 (57,14%) por el método de Ritchie y la detección serológica por el método de hemaglutinación indirecta arrojó sólo 38 (54,29%), concluyendo que el método directo permitió la detección del mayor número de positivos, lo que podría atribuirse a falsos positivos debido a que el diagnóstico coproparasitológico de *E. histolytica* esta basado rutinariamente en el hallazgo de quistes y/o trofozoítos los cuales podrían confundirse con macrófagos que también pueden contener glóbulos rojos. Estas dificultades diagnósticas originaron el desarrollo de técnicas de detección antigénica (Stracham y cols., 1988; Abd-Alla y cols., 1993; Haque y cols., 1993; Haque y cols., 1995; Haque y cols., 1997) así como también detección de secuencias de ADN específicas por PCR (Tannich y Burchard, 1991; Romero y cols., 1992; Acuña y cols., 1994; Katzwinkel y cols., 1994; Britten y cols., 1997; Newton y cols., 1997).

Al respecto, en esta investigación se demostró que el diagnóstico de *Entamoeba* presentó variación en función a la técnica utilizada, encontrando que el examen directo convencional permitió la mayor detección del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* (11,17%) seguido de la coloración tricrómica (5,08%), pero estas técnicas no fueron útiles para la identificación de especies, debido a que en esta investigación las muestras positivas solo presentaron formas quísticas de estas amibas que son indistinguibles morfológicamente. Sin embargo, al aplicar la técnica de PCR para la identificación especie-específica se encontró una disminución significativa en el

número de muestras detectadas por PCR (7/ 317) con respecto al método directo (22/317). De las 7 muestras detectadas por PCR 4 fueron identificadas como *E. histolytica* y 3 como *E. dispar*, estos resultados sugieren posibles falsos positivos del método directo al diagnóstico de

E. histolytica, lo que difiere del estudio de Ben y cols. (2008) quienes al analizar 12 muestras diagnosticadas por método directo positivas al complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*, 11 de estas resultaron positivas a *E. dispar* por PCR y 1 negativa, concluyendo que es necesario la aplicación de técnicas complementarias que permitan el diagnóstico específico de las especies del género *Entamoeba* para evitar terapias innecesarias.

De igual forma, Hooshyar y cols. (2003) quienes evaluaron 12 148 muestras de heces en Irán, encontraron que 87 (0,7%) fueron positivas a *E. histolytica* y/o *E. dispar* por métodos directo y formalina-éter y de éstos 49 (62,8%) lograron ser cultivados en medio Robinson. Estos cultivos al ser analizados con la técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se demostró que 46 casos (93,9%) eran *E. dispar*, sólo 2 casos (4,1%) fueron identificados como *E. histolytica* y una persona (2%) presentó infección mixta con ambas especies, estos resultados ponen en evidencia que *E. dispar* es mucho más prevalente que *E. histolytica*.

Una explicación de la diferencia de positivos encontrados entre la PCR y los métodos parasitológicos convencionales usados en este estudio, es que posiblemente las muestras identificadas como positivas al complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* que no amplificaron por PCR pudieran ser debidas a la observación de leucocitos, macrófagos u otras células del hospedero, así como también a la presencia de otras especies como *E. moshkovskii*, *E. hartmanni* y quistes inmaduros de *E. coli*, las cuales no fueron diferenciadas, en este sentido, el estudio de Ali y cols. (2003) avala nuestros resultados, al reportar que de 109 muestras de heces provenientes de niños

de preescolar en Bangladesh encontraron 39 muestras (35,8%) positivas para *E. dispar*, 23 (21,1%) resultaron para *E. moshkovskii* y 17 (15,6%) fueron positivas a *E. histolytica*, concluyendo que la alta frecuencia de *E. moshkovskii* encontrada sugiere que los humanos son verdaderos hospedadores de esta amiba.

Otros autores como Parija y Khairnar (2007), quienes al analizar 202 muestras fecales de individuos provenientes de Pondicherry, India, con observación microscópica de quistes y/o trofozoítos de especies de Entamoeba, detectaron por Nested-Multiplex PCR un 49,50% de infección por *E. dispar*, 7,40% para *E. histolytica* y 1,00% para *E. moshkovskii*, además se obtuvieron infecciones mixtas y triples de estas especies. Por su parte, Fotedar y cols. (2008) al estudiar 110 pacientes con cuadros diarreicos y otros trastornos gastrointestinales, positivos a especies de *Entamoeba*, reportan que 50% de las muestras fueron positivas para *E. moshkovskii* encontrándose asociado a dichos trastornos gastrointestinales. El ADN de *E. moshkovskii* no fue detectado en las muestras fecales de individuos controles. Estos resultados sugieren que *E. moshkovskii* no es simplemente un protozooario ocasional y/o comensal del tracto gastrointestinal humano, lo que provee evidencias de *E. moshkovskii* pudiera ser un potencial patógeno que causa cuadros diarreicos y desordenes gastrointestinales.

En cuanto a la sintomatología, en este estudio se encontró que el complejo *E. histolytica/E. dispar* se observó con mayor frecuencia en los individuos sintomáticos (6,31%), de estas se detectaron 4 casos sintomáticos de *E. histolytica* por PCR (18,20%), en los cuales se evidenció presencia de sangre y moco en la materia fecal. Es importante mencionar que la ausencia de sangre no descarta la presencia de *E. histolytica* en las heces de los pacientes, dado que en muchos casos va a depender de la respuesta del hospedero y de la virulencia de la amiba (Fonte, 2000). Además, hay que resaltar que en esta investigación de los 3 casos identificados por la técnica

molecular como *E. dispar*, 2 de ellos se encontraron en individuos sintomáticos con presencia de moco en las heces.

Se ha reportado que prácticamente en todos los casos de colitis amibiana se produce sangramiento macro y microscópico de la mucosa intestinal y que éste puede ser detectado mediante la búsqueda de trofozoítos en las muestras de heces (Haque y cols., 2003). Fonte (2002) menciona que en la infección intestinal por *E. dispar* no se evidencia la presencia macro y microscópica de sangre en las heces, dado que hasta ahora no se ha comprobado ninguna acción patógena de esta especie. El dolor abdominal, náuseas y vómitos fueron los síntomas presentados en los pacientes evaluados en esta investigación, mostrando asociación con la presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*, al respecto se ha reportado que el dolor abdominal es el síntoma más frecuente de la amibiasis intestinal dada la acción lítica de los trofozoítos en el intento de penetrar al intestino (Martínez, 2001). Estos resultados son similares a los reportados por Haque y cols. (2003), quienes encontraron al dolor abdominal como síntoma frecuente en los pacientes con diarrea asociados a cuadros con *E. histolytica*.

Las infecciones por *E. histolytica* cursan con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden variar desde infecciones asintomáticas hasta infecciones invasivas; sin embargo, estas variaciones del cuadro clínico en los individuos no están esclarecidas, aunque ya se ha evidenciado que las amibas que causan los cuadros gastrointestinales y las que logran invasión hepática son genéticamente diferentes, sugiriendo que estas amibas muestran diferente tropismo por los órganos blanco o sufren reorganización del ADN antes o durante la metástasis desde el intestino al hígado (Ali y cols., 2008). Ayeh-Kumi y cols. (2001), al evaluar la diversidad genética de 54 aislados clínicos en Bangladesh por RFLP, encontraron diferentes patrones de restricción tanto en los aislados de abscesos hepáticos como en los intestinales, señalando que la correlación de diferencias genéticas con el potencial

patogénico de *E. histolytica* y sus implicaciones en la inmunoprofilaxis, requieren ser estudiado.

Por otro lado, Helmy y cols. (2007), al evaluar 47 individuos con *Entamoeba* (36 con quistes y 11 con trofozoítos) y 40 individuos asintomáticos (4 individuos presentaron quistes), utilizando Nested PCR, encontraron 31 casos de *E. histolytica* (60,8%), 9 casos de *E. dispar* (17,6%) y 11 (21,6%) presentaron infección mixta. Sólo las infecciones por *E. histolytica* estudiadas fueron sintomáticas.

A pesar de que el uso de la PCR para diagnóstico de rutina resulta ser costoso, requiere entrenamiento de personal, equipos específicos y de espacio físico adecuado a las exigencias de la prueba, es una metodología útil en la detección e identificación de agentes patógenos, así como también en trabajos epidemiológicos donde se analizan grandes cantidades de muestras, sobre todo en regiones endémicas donde se pretenda conocer cifras exactas de prevalencias. También deben ser aprovechados los aspectos positivos de la PCR para ser aplicados en laboratorios de referencia, donde puedan ser atendidos casos de emergencia que requieran de un diagnóstico exacto del agente etiológico para la aplicación de tratamientos efectivos (Mora, 2006).

El diagnóstico clínico de la amibiasis intestinal y los estudios epidemiológicos se han realizado empleando la identificación microscópica de trofozoítos y quistes del género *Entamoeba* en la materia fecal, pero este método ha demostrado ser laborioso y requiere personal bien entrenado, aunado esto a su baja sensibilidad por resultados falsos positivos (Urdaneta y cols., 1996). Existe en la actualidad un número sustancial de trabajos realizados en diferentes partes del mundo que reclaman la necesidad de un diagnóstico específico para la amibiasis. La incorporación de nuevas tecnologías de diagnóstico molecular ha incrementado su uso, tanto en el diagnóstico clínico como en trabajos de investigación, en orden de minimizar la aplicación de tratamientos en individuos infectados con otras especies de *Entamoeba* como *E. dispar* y

E. moshkovskii, lo que contribuye además a comprender el curso de estas infecciones que son problemas de salud pública, así como también a la aplicación de medidas terapéuticas y de control de las mismas.

CONCLUSIONES

El examen directo de la materia fecal fue el método que registró el mayor número de casos positivos para el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

La PCR mostró ser un método de diagnóstico adecuado para la diferenciación de las especies *E. histolytica* y *E. dispar*.

Todos los individuos infectados con *E. histolytica* manifestaron síntomas clínicos además de los signos moco y sangre vinculados en los cuadros disintéricos.

Se evidenció que los casos identificados como *E. dispar* pueden ser diagnosticados tanto en individuos sintomáticos como en asintomáticos.

Dentro de las variables clínico-epidemiológicas evaluadas, la diarrea, vómitos, náuseas, dolor abdominal, y observación de moco en la materia fecal se encontraron asociadas a la presencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

La presencia de *Blastocystis hominis* estuvo asociada a las infecciones por el complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, M.; Jackson, T.; Gathiram, V.; El-Hawey, A. y Ravdin, J. 1993. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. J. Clin. Microbiol., 31: 2845–2850.
- Acuña, R.; Samuelson, J. y De Girolami, P. 1994. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 48: 58–70.
- Aguirre, A.; Molina, S.; Urdaneta, H.; Cova, J. y Guhl, F. 1997. Characterization of two venezuelian *Entamoeba histolytica* strains using electrophoretic isoenzyme patterns and PCR-SHELA. Arch. Med. Res., 28: 285-287.
- Ali, I.; Nu, P.; Dinh, B.; Viet, T.; Van, A.; Clark, C. y Tannich, E. 2003. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. J. Clin. Microbiol., 41: 4745-4750.
- Ali, I.; Clark, C. y Petri, J. 2008. Molecular epidemiology of amebiasis. Infect. Genet. Evol., 28: 120-142.
- Ankri, S.; Padilla-Vaca, F.; Stolarsky, T.; Koole, L.; Katz, U. y Mirelman, D. 1999. Antisense inhibition of the Light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. Mol. Microbiol., 33: 327–337.
- 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 Haque, R. 2001. *Entamoeba histolytica* : genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. Expo. Parasitol., 99: 80-88.
- Barahona, L.; Maguiña, C.; Náquira, C.; Terashima, I. y Tello, R. 2003. Blastocystosis humana: Estudio prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. Rev. Gastroenterol., 23: 29-35.
- Basualdo, J.; Córdova, M.; De Luca, M.; Ciarmela, M.; Pezzani, B.; Grenovero, M. y Minvielle, M. 2007. Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. Rev. Inst. Med. Trop., 49: 251-255.

- Ben, A.; Ben, R.; Mousli, M.; Aoun, K.; Thellier, M. y Bourafbine, A. 2008. Molecular differentiation on *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from Tunisian food handlers with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. Parasite., 15: 65-68.
- Blanco, Y.; Guerrero, L.; Herrera, L.; Amaya, I. y Devera, R. 2007. Parásitos intestinales en inmigrantes de la República Popular China residentes en Ciudad Bolívar, Venezuela. Parasitol. Latinoam., 62: 42-48.
- Botero, D. y Restrepo, M. 1998. Parasitosis humanas. Corporación para investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 3^{ra} Edición.
- Braga, L.; Ninomiya, H.; McCoy, J.; Eacker, S.; Wiedmer, T. y Pham, C. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest., 90: 1131-7.
- Britten, D.; Wilson, S.; McNerney, R.; Moody, A.; Chiodini, P. y Ackers, J. 1997. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. J. Clin. Microbiol., 35: 1108-1111.
- Brumpt, E. 1925. Sommaire de “*Entamoeba dispar*” sp. Amibe a’ kystes quadrinuclees parasite de homme. Bull. Acad. Med., 94: 943-952.
- Cabrera, F. 1999. Diagnóstico Clínico de la Amibiasis. Medicina y Mercadotecnia, S.A. de C.V. 1^{era} Edición. México.
- Chacín, L. 2001. Relevancia del Reconocimiento de *Entamoeba dispar* en la Amibiasis. Invest. Clín., 42: 157-160.
- Chacin, L.; Mathews, H. y Guanipa, N. 1990. Estudio Seroepidemiológico de la amibiasis en una comunidad del Zulia, Venezuela. Rev. Inst. Med. Trop., 32: 467-473.
- Chester, P.; Clifton, R. y Wayne, E. 1992. Parasitología Médica. Salvat editors S.A., Barcelona, España.
- Cochran, W. 1985. Técnica de muestreo. Segunda edición. Editorial Continental. México.
- Devera, R.; Blanco, Y.; Requena, I. y Velásquez, V. 2006. Diagnóstico de *Blastocystis hominis*: bajo rendimiento de los métodos de concentración formol-éter y sedimentación espontánea. Rev. Biomed., 17: 231-233.

- Devera, R.; Cermeño, J. y Blanco, Y. 2003. Prevalencia de Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en una comunidad rural del Estado Anzoátegui, Venezuela. Parasitol. Latinoam., 58: 95-100.
- Devera, R.; Ortega, N. y Suárez, M. 2007. Parásitos intestinales en la población del Instituto Nacional del Menor, Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol., 27: 1.
- 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.
- Evangelopoulos, G.; Spanacos, E.; Patsoula, N. y Vakalis. 2000. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Am. Of. Trop. Med. Parasitol., 3: 233-240.
- Flores, L.; Estrada, T.; Shibayama, M.; Campos, R.; Bacon, K.; Martinez, A. y Tsutsumi, V. 1997. In vitro *Entamoeba histolytica* adhesion to human endothelium: a comparison using two strains of different virulence. Parasitol. Res., 83: 397-400.
- Fonte, L. 2000. Amebiasis: Enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. Editorial Elfos Scientiae, La Habana Cuba.
- Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J. y Harkness, J. 2007. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin. Microbiol. Rev., 20: 511-532.
- Fotedar, R.; Stark, D.; Marriott, D.; Ellis, J. y Harkness, J. 2008. *Entamoeba moshkovskii* infections in Sydney, Australia. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 27: 133-137.
- Gathiram, V. y Jackson, T. 1985. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. Lancet., 1: 719-721.
- Goncalves, A.; Viana, J.; Pires, E.; Boia, M.; Coura, J. y Silva, E. 2007. The use of the antifungal agent miconazole as an inhibitor of *Blastocystis hominis* growth in *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* cultures. Rev. Inst. Med. Trop., 49: 201-202.

- Gonzalez, 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.
- Guimarães, S. y Leme, M. 1993. *Blastocystis hominis* Occurrence in Children and staff Members of Municipal Daycare centers from Botucatu. Sao Paulo State, Brazil. Men. Inst. Oswaldo Cruz, 88: 42-45.
- Gutiérrez-Kobe, L.; Cabrera, N. y Pérez-Montfort, R. 1997. A mechanism of acquired to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. J. Parasitol., 83: 234-241.
- Haghighi, A.; Kobayashi, S.; Takeuchi, T.; Thammapalerd, N. y Nozaki, T. 2003. Geographic Diversity among Genotypes of *Entamoeba histolytica* Field Isolates. J. Of. Clin. Microbiol., 41: 3748-3756.
- Haque, R.; Ali, I.; Akther, S. y Petri, J. 1999a. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J. Of. Clin. Microbiol., 36: 449-452.
- Haque, R.; Ali, M.; Akther, S. y Petri, W. 1999b. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. J. Trop. Med. Hyg., 60: 1031-1034.
- Haque, R.; Faruque, A.; Hahn, P.; Lysterly, 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.; Kress, K.; Wood, S.; Jackson, T.; Lysterly, D. y Wilkins, T. 1993. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. J. Infect. Dis., 167: 247-249.
- 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.
- Helmy, M.; Rashed, L. y Abdel-Fattah, H. 2007. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR. J. Soc. Parasitol., 37: 257-274.
- Hiatt, R. y Ernest, N. 1995. How many stool examinations are necessary to detect

- pathogenic intestinal protozoa?. Am. J. Trop. Hyg., 53: 36-39.
- Homéz, J.; Soto, R.; León, P. y Soto, S. 1995. Parasitología. Editorial de Luz. Zulia. Venezuela. 339 pp.
- Hooshyar, H.; Rezaian, M. y Kazemi, B. 2003. Distribution and differential diagnosis of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* by the PCR-RFLP method in Central Iran. Ann. Saudi. Med., 23: 363-366.
- Huston, C.; Haque, R. y Petri, W. 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J. Clin. Microbiol., 31: 2845-2850.
- Huston, C. y Petri, W. 1999. Amebiasis: Clinical Implications of the Recognition of *Entamoeba dispar*. Curr. Infect. Dis. Rep., 1: 441-447.
- Jaimés, R. 2004. Diagnóstico de Amibiasis en Pacientes que Acuden a Centros Asistenciales de Carúpano, Estado Sucre. Trabajo de Pre-Grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 31 pp.
- Katzwinkel, W.; Loscher, T. y Rinder, H. 1994. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. Am. J. Trop. Med. Hyg., 51: 115-118.
- Krogstad, D.; Spencer, H. y Healy, G. 1978. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. Ann. Intern. Med., 88: 89-97.
- Mac Pherson, D. y Mac Queen, W. 1994. Morfology Cal Diversity of *Blastocystis hominis* I Sodium Acetat Acid Formalin Preserved Stool Samples Stained With Iom Hematoxylim. J. Dim. Microbiol., 32: 268-276.
- Martínez, P. 2001. The pathogenesis of amibiasis. Parasitol. Today, 3: 111-118.
- Matijasevic, E. 1989. Actualizaciones en Amibiasis: Amibiasis Asintomática, espectro clínico y tratamiento. Fascículo 1. Editorial Tribuna Médica. 1-15.
- Mercado, R.; Castillo, D. y Muños, V. 2003. Infecciones por protozoos y helmintos intestinales en pre-escolares y escolares de la columna de colina, Santiago, Chile. Parasitol. Latinoam., 58: 173-176.
- 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.

- Miller, S. y Polesky, H. 1988. A simple Saltingout Procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acid. Res., 16: 1215.
- 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.
- Michelle, E. y De Donato, M. 2001. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en habitantes de Río Caribe, estado Sucre, Venezuela. Saber, 2: 105-112.
- 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. 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.
- Morales, G. y Pino, L. 1995. Parasitometría. Clemente editores, C.A. 356 pp.
- Navarro, P. y Reyes, H. 1999. Las infecciones parasitarias en la frontera de tercer milenio. El Nacional (mayo, 1999). 29 pp.
- Newton, O.; Sturm, K.; Romero, J.; Santos, J. y Samuelson, J. 1997. High rate of ccult infection with *Entamoeba histolytica* among non-dysenteric Mexican children. Arch. Med. Res., 28: S311-S313.
- Nozaki, T.; Aca Ida, S.; Okuzawa, E.; Magalhaes, M.; Tateno, S. y Takeuchi, T. 1990. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the northeast of Brazil. Trans. Of the Royal Soc. Of Trop. Med. Hyg., 84: 387-8.
- Ozcakir, O.; Gureser, S.; Erguven, S.; Akyon, Y.; Topaloglu, R. y Hascelik, G. 2007. Turkiye’ deki Bir Universite Hastanesinde *Blastocystis hominis* Enfeksiyonunun Karakteristigi. Turkiye. Parazitoloji. Dergisi., 31: 277-288.
- Parija, S. y Khairnar, K. 2007. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. J. Health. Popul. Nutr., 23: 292-295.
- Pérez, E. 1993. Algunos criterios y Técnicas para Investigar la Etiología Parasitaria de Diarrea en Niños. Universidad Central de Venezuela. Cátedra de parasitología. Caracas, 20 pp.
- Petri Wa, J.; Jackson, T.; Gathiram, V.; Kress, K.; Saffer, L. y Snodgrass, T. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be

- differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infect. Immun., 58: 1802-6.
- Petri Wa, J.; Joyce, M.; Broman, J.; Smith, R.; Murphy, C. y Ravdin, J. 1987. Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. Infect. Immun., 55: 2327-31.
- Pinilla, E.; López, M. y Viasus, D. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. Rev. Med., 136: 118-124.
- 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.
- Raj, L. y Upcrof, T. 2001. Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. Rev. Latinoam. Microbiol., 43: 183-187.
- Rashidul, M.; Huston, C.; Hughes, M.; Houpt, E. y Petri, M. 2005. Amebiasis. N. Engl. Med., 16: 348.
- Reyes, L. y León, R. 2002. Diferenciación de *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. Rev. Costarric. Cienc. Med., 23: 3-4.
- Rivera, W.; Tachibana, H. y Kambara, H. 1998. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59: 916-921.
- Romero, J.; Descoteaux, S.; Reed, S.; Orozco, E.; Santos, J. y Samuelson, J. 1992. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. Arch. Med. Res., 23: 277-279.
- Sánchez, Y. 1999. Evaluación de las técnicas coproparasitológicas empleadas para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” Cumaná, Estado Sucre. Trabajo de Pre-Grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 29 pp.
- Sargeant, P. 1985. Zymodemes expressing possible genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Trans. Of the Royal Soc. Of. Trop. Med. Hyg., 79: 86-9.
- Sargeant, P.; Baveja, U.; Nanda, R. y Anand, B. 1984. Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*: identification of zymodeme XIV in India. Trans. Of the Royal Soc. Of. Trop. Med Hyg., 78: 96-101.

- Sargeant, P.; Jackson, T.; Wiffen, S.; Bhojnani, R.; Williams, J. y Felmingham, D. 1987. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. Arch. Invest. Med., 18: 69-75.
- Sargeant, P.; Williams, J. y Grene, J. 1978. The differentiation of invasive and noninvasive *E. histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. of the Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 72: 519-521.
- Schnell, S. y Mendoza, C. 1997. Theoretical description of the polymerase chain reaction. J. Theor. Biol., 3: 31-38.
- Sepúlveda, B. y Tremiño-García, N. 1989. Cuadro Clínico y diagnóstico de la Amibiasis. 1^{era} Edición. México. Editorial Médica Panamericana.
- Shanta, K.; Bhat, K.G.; Patil, C. y Joglekar, H. 1998. Evaluation of laboratory techniques for diagnosis of amoebiasis. J. Commun. Dis., 30: 103-106.
- Simonetta, G.; Swierczynski, G.; Robinson, F.; Anselmi, M.; Corrales, J.; Moreira, J.; Montalvo, G.; Bruno, A.; Maserati, R.; Bisoffi, Z. y Scaglia, M. 2002. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: A study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg., 67: 123-127.
- Sommer, R. y Tautz, D. 1989. Minimal homology for PCR primer. Nucl. Acids. Research., 17: 6749.
- Stracham, W.; Spice, W.; Chiodini, P.; Moody, A. y Ackers, J. 1988. Immunological differentiation of pathogenic y nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Lancet, 561-563.
- Tannich, E.; Horstmann, R.; Knobloch, J. y Arnold, H. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 5118-5122.
- Tannich, E. y Burchard, G. 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. J. Clin. Microbiol., 29:250-255.
- Tanyuksel, M. y Petri, W. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin. Microbiol. Rev., 16: 713-729.
- Urdaneta, H.; Cova, J.; Molina, S.; Aguirre, A. y Hernández, M. 1998. Evaluación inmunológica de cepas de *E. histolytica* Venezolanas. Kasmera, 26: 35-49.

- Urdaneta, H.; Rangel, A.; Martins, M.; Muñoz, J. y Hernández, M. 1996. *Entamoeba histolytica*: fecal antigen capture immunoassay for the diagnosis of enteric amebiasis by a monoclonal antibody. Rev. Inst. Med. Trop., 38: 39-44.
- Urdaneta, H.; Rondón, M.; Muñoz, M. y Hernández, M. 1995. Isolation and xenization of two *Entamoeba histolytica* strains. G E N, 49: 23-28.
- Walsh, J. y Warren, K. 1979. Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing countries. N. Eng. J. Med., 301: 967-74.
- Willhoeft, U.; Hamann, L. y Tannich, E. 1999. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and Positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. Infect. Immunol., 67: 5925-5929.
- Who Meeting. 1985. Amoebiasis and its control. Bull. Who., 63: 417-26.
- Who/Paho/Unesco Report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January 1997. Epidemiol Bull. 1997 18:13-4. Disponible en: http://www.paho.org/english/sha/epibul_95-98/be971amo.htm Consultado el 7 de abril de 2005].
- World Health Organization Report of a consultation of experts on amoebiasis. Weekly Epidemiol. Rep., 1997. 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.

(ANEXO I)
CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación de la Licenciada Leonor Mora, se realizará el proyecto de investigación titulado: **“*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”**.

Yo: _____
Nacionalidad: _____ Estado Civil: _____
Domiciliada en: _____

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que nadie coaccione, ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgo relacionado con el estudio indicado, declaro mediante la presente:

- a. Haber sido informado(a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: **“*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”**.
- b. Tener conocimiento claro que el objetivo del trabajo es: evaluar la frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre.
- c. Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en: donar de manera

voluntaria una muestra de heces, recolectada por el personal encargado de la investigación.

- d. Que la muestra de heces que acepto donar será utilizada única y exclusivamente para determinar la presencia de parásitos.
- e. Que el equipo de personas que realiza la investigación coordinada por la Licenciada Leonor Mora, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
- f. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
- g. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo e inconvenientes algunos para mi salud.
- h. Que cualquier pregunta que tenga relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas, con quienes me puedo comunicar por el teléfono (0416) 7932026 con la Licenciada Leonor Mora.
- i. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto que los hallazgos que pueda producirse en el referido proyecto de investigación.

(ANEXO II)
DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIADO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formado de consentimiento y por cuanto a mi participación en este estudio es totalmente voluntario, acuerdo:

- a. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en las muestras de heces que acepto donar para los fines indicados anteriormente.
- b. Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del voluntario: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Fecha: _____

Firma del Testigo: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Fecha: _____

Firma del Testigo: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Fecha: _____

(ANEXO III)
AUTORIZACIÓN

Yo, _____ C.I. _____ autorizo a los investigadores de este estudio a utilizar toda la información necesaria, para la recolección de las muestras de heces de mi representado, que serán usadas en el desarrollo del proyecto de grado titulado: **“*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”**.

Firma del representante

(ANEXO IV)

ENCUESTA

DATOS PERSONALES

Nombre del Paciente:	Nº de muestra:	Fecha:
Centro Asistencial:		
Sexo:		Edad:
<u>DATOS CLÍNICOS</u>		
Diarrea:	Inicio de la diarrea:	Evacuaciones por día:
Presencia de moco:		Presencia de sangre:
Vómitos:	Flatulencias:	Nauseas:
Dolor abdominal:	Fiebre:	Tenesmo:

HOJA DE METADATOS

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

Título	<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes Centros de Salud de la Ciudad de Cumaná, Estado Sucre.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rodríguez C. María E.	CVLAC	16703410
	e-mail	Jmariu1211@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>
Amibiasis

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

La redescrición de *E. histolytica* como especie patógena, causante de la amibiasis con respecto a *E. dispar*, reconociéndola como especie comensal, ha cambiado claramente la visión en el enfoque del cuadro clínico, el diagnóstico y el tratamiento de estas infecciones. En Venezuela, el diagnóstico de laboratorio se realiza a través del examen coproparasitológico de la materia fecal por observación microscópica, dado que son dos especies morfológicamente indistinguibles, esto conduce a la aplicación de tratamientos erróneos que conducen a los individuos a infecciones más severas y complicaciones secundarias. En este sentido, el objetivo de la presente investigación consistió en evaluar la frecuencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en individuos sintomáticos y asintomáticos por métodos convencionales y moleculares provenientes de diferentes centros de salud de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Para ello se analizaron 317 muestras fecales de individuos sintomáticos y asintomáticos de ambos sexos y diferentes grupos etarios, aplicando consentimiento informado y una encuesta clínica a cada individuo. Se analizaron por métodos coproparasitológicos: examen directo solución salina fisiológica al 0,85%, lugol, Quensel y coloración tricómica. El diagnóstico molecular se realizó a partir de la materia fecal utilizando el kit Wizard Genomic® de Promega, amplificando por Nested- multiplex PCR la subunidad pequeña de ARN 16S. En la población evaluada se registró un 62,14% de infecciones por protozoarios y helmintos intestinales a través del método directo, donde *Blastocystis hominis* (47,00%) fue el más frecuente, seguido de *Giardia duodenalis* (9,15%) y el complejo *E. histolytica/E. dispar* (6,94%). El diagnóstico de este último varió dependiendo del método empleado, observando que de 22 casos detectados por el examen directo, solo 10 (3,15%) se identificaron con la coloración tricrómica. Al realizar detección e identificación de estas especies por PCR se encontraron 4 casos sintomáticos de *E. histolytica* (1,26%) y 3 de *E. dispar* (0,95%), estos últimos distribuidos en individuos sintomáticos (2) y asintomáticos (1). Las variables clínicas: moco, náuseas, dolor abdominal y vómitos se encontraron asociadas significativamente a la presencia del complejo *E. histolytica/E. dispar*. Por otro lado, este complejo mostró asociación significativa con la presencia de *Blastocystis hominis*. En conclusión, la técnica de PCR demostró ser útil en la diferenciación de estas dos especies, además de evidenciar infecciones por *E. dispar* en individuos tanto sintomáticos como asintomáticos.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Mora, Leonor	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	9273164
	e-mail	moralobianco@hotmail.com
	e-mail	
Rodolfo, Hectorina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11831659
	e-mail	Hrodulfo2002@yahoo.es
	e-mail	
Guilarte, Del Valle	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	delguifa@gmail.com
	e-mail	
Gómez, Erika	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	13539455
	e-mail	eri1578@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	02	25

Lenguaje: spa _____

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis RCME	Application/Word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Bioanálisis _____

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura _____

Área de Estudio:

Bioanálisis _____

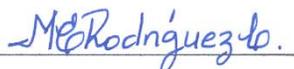
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

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. María E. Rodríguez C.
AUTOR



Profa. Leonor Mora
Asesora



Profa. Hectorina Rodolfo
Co-Asesora



Profa. Del Valle Guilarte
Jurado 1



Profa. Erika Gómez
Jurado 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



