

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* EN
MUESTRAS DE HECES Y DEL ASPIRADO DE ABSCESOS
HEPÁTICOS AMIBIANOS, EN EL ESTADO DE SONORA**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M. en C. OLIVIA VAENZUELA ANTELO

México, DF. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la U. N. A. M., bajo la dirección de la Dra. Cecilia Ximénez García.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT, bajo el número de becario 93693

IN MEMORIAM

**RUBÉN VALENZUELA GRANILLO
JAVIER RAMÓN VALENZUELA ANTELO**

**Mi padre y hermano, legado invaluable de lucha y amor,
así como el gran ejemplo de vivir intensamente.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sus bendiciones

A mis padres

† Rubén Valenzuela Granillo y Maclovía Antelo Coronado
por su amor y entrega

A mi esposo

Jesús Hernández López por su amor y apoyo
A mis hijos Emilio y Sofía por quererme tanto

A mis hermanos que quiero mucho:

Jesús Rubén y Lorena

Elsa Alicia

Griselda

† Javier Ramón y Georgina Margarita

José Ariel y Ana Gabriela

Rosario Alma

Adalberto y Susy

David y Xochitl

Luz María y Javier

Evangelina y Julio

Sandra Judith y Gregorio

Adrián Humberto y Marisela

A María Elena Ortiz Tadeo

Quién me adoptó como parte de su familia y así lo siento

Dra Cecilia Ximénez García, asesora académica y amiga.

A los Doctores:

Ruy Perez Monfort, Valeria Souza Saldivar, Anaid Antaramian, Isaura Meza Gómez Palacio, Edda Lydia Sciutto Conde, Julio Granados Arreola, Por haber aceptado fungir como sinodales y su valioso apoyo.

A los Doctores:

Emma I. Melendro, Rogelio Sotelo, María Islas, Adriana Garibay, Ramón Zepeda, Eduardo Ruíz, Juan Carlos Galvez, Carlos Velázquez, Javier Castillo, Enrique Velázquez, Magaly González, Cardoza Amador, Norberto Gómez, Sandra Zamorano, Sandra Gavilanes, Martha Zaragoza, Alberto Díaz, Aracely Angulo. Por su apoyo y palabras de aliento en cada momento.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM.

A mis amigos y compañeros de la Universidad de Sonora

A todos mis maestros y amigos que me apoyaron a llegar hasta la culminación de mis estudios de Posgrado.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad de Sonora, Hospital del Instituto de Seguridad Social de los Trabajadores del Estado Hospital General del Estado de Sonora, Hospital Infantil del Estado de Sonora, Hospital Regional Zona 2 del Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital de Ginecopediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social.

CONTENIDO

	Página
Contenido	4
Lista de Tablas y Figuras	5
Abreviaturas	8
Resumen	10
Abstract	12
Antecedentes	14
Objetivos	25
Hipótesis	26
Material y Métodos	27
Resultados	35
Discusión	55
Conclusiones	62
Bibliografía	63
Anexo I	67
Anexo II	74
Anexo III	78

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla		Pág.
1	Iniciadores utilizados.	31
2	Incidencia de AHA en Hermosillo, Sonora.	37
3	Frecuencia de AHA distribuidos por género.	38
4	Incidencia de egresos hospitalarios por AHA en el período 2000-2005: distribución de incidencia según rango de edad	39
5	Frecuencia mensual de AHA en el período 2000-2005 en la Cd. de Hermosillo, Sonora.	40
6	Muestras analizadas.	45
7	Heptapéptidos.	50
8	Patrones de secuencias de aa en el segmento polimórfico del gen CHI, en aislados de <i>Eh</i> provenientes del Municipio de Hermosillo	51
Figura		Pág.
1	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> .	23
2	Trofozoíto y quiste de <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> .	24
3	Área geográfica con el mayor número de abscesos hepático amibianos.	36
4	Tasa de Incidencia de egresos hospitalarios por AHA en Hermosillo, Sonora.	37
5	Resultado de los coproparasitoscópicos de individuos	42

asintomáticos (Faust-Ferreira).

6	Distribución de los parásitos en los 27 sujetos CPS (+).	43
7	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con el ADN de las muestras de pacientes con All y los iniciadores CHI.	46
8	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con el ADN de las muestras y los iniciadores CHI	46
9	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con el ADN de las muestras y los iniciadores CHI	47
10	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con el ADN de las muestras de AHA y los iniciadores CHI	47
11	Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento polimórfico del gen que codifica para las CHI	48
12	Alineamientos del fragmento de la CHI obtenida de los aislados	50
13	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con los iniciadores del fragmento de la Hsp1-2, obtenida de los aislados de AHA.	52
14	Alineamiento de las secuencias del producto de PCR obtenido con los iniciadores para Hsp1-2, obtenida de los aislados de AHA.	52
15	Electroforesis de los amplificadores obtenidos con los iniciadores del fragmento SQ, obtenida de los aislados de AHA	53
16	Alineamiento las secuencias de los fragmentos	53

obtenidos en la PCR con iniciadores para los segmentos SQ, obtenida de los aislados de AHA.

- | | | |
|----|---|----|
| 17 | Amplificación del segmento S ^{tg} a D H3 de <i>Entamoeba histolytica</i> de muestras de absceso hepático. | 54 |
| 18 | Alineamiento las secuencias de los fragmentos obtenidos en la PCR con iniciadores para los segmentos S ^{tg} a D H3, obtenida de los aislados de AHA. | 54 |

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
AII	Amibiasis intestinal invasiva
AHA	Absceso hepático amibiano
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina (Albumin from bovine serum)
°C	Grados centígrados
CHI	Quitinasa (Chitinase)
CPS	Coproparitoscópico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<i>Ed</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA Assay)	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
g	Fuerza centrífuga relativa
hrs	Horas
HIES	Hospital Infantil del Estado de Sonora
HGES	Hospital General del Estado de Sonora
HRZ2	Hospital Regional Zona 2
HGP	Hospital de Ginecopediatría
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad Social de los Trabajadores del Estado
min	Minutos
mM	Milimolar
M	Molar
Neg	Negativo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PORT	Portadores asintomáticos de <i>Entamoeba histolytica</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SRP	Proteína Rica en Serina (Serine Rich Protein)
SS	Solución salina
TBE	Tris-boratos-EDTA
U	Unidades enzimáticas

μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

El presente trabajo es un estudio retrospectivo de la prevalencia de absceso hepático amibiano en el Estado de Sonora del año 2000 al 2005, en el cual se detectaron 319 casos, con una tasa de incidencia de 1.19 casos por cada 1000 egresos hospitalarios. A pesar de que este padecimiento afecta preferentemente al género masculino en edad adulta y la mayoría de nuestros casos fueron varones, se registraron 4 recaídas de este padecimiento, las cuales se presentaron en mujeres menores de edad.

Considerando la alta incidencia de AHA, se procedió a la búsqueda de *E. histolytica*, agente causal de la amibiasis, en muestras de heces de pacientes con amibiasis intestinal invasiva y de portadores asintomáticos. Inicialmente, la búsqueda se basó en el estudio coproparasitológico (Faust-Ferreira) en portadores asintomáticos, en el cual se concentran los quistes de parásitos, a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de DNA que posteriormente se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para realizar un primer análisis de detección de *E. histolytica* en las muestras de heces de pacientes con probable amibiasis intestinal se les determinó la presencia de la lectina amibiana a través de un ensayo inmunoenzimático específico y posteriormente se procedió a la extracción de ADN. El material obtenido de la aspiración de los AHA se procesó para la extracción de ADN. Posteriormente se utilizó la PCR para la amplificación de las regiones altamente polimórficas de los genes para quitinasa así como también de los

segmentos intergénicos de los genes para tRNA.

Lo anterior nos permitió obtener el genotipo respectivo de los diferentes aislados de *E. histolytica* obtenidos de los casos incluidos en el estudio. Nuestros resultados sugieren que existe una asociación entre el genotipo del parásito y el resultado de la infección en el huésped, ya que los genotipos que encontramos en nuestros pacientes particularmente en aquellos con absceso hepático amibiano parecen coincidir, al menos parcialmente con los reportados en otras áreas endémicas de amibiasis fuera del territorio nacional.

Por otro lado, reportamos también el caso de un paciente con AHA, en el cual se identificaron dos variantes genéticas diferentes de *E. histolytica*. Una proveniente de un absceso localizado en el lóbulo hepático derecho y la otra obtenida en el material drenado del absceso del lóbulo hepático izquierdo. Este hallazgo es el primero que se reporta en su tipo y que apoya la existencia de nichos ecológicos en el medio ambiente que albergan organismos genéticamente heterogéneos capaces de producir daño tisular.

ABSTRACT

The present work is a retrospective study of prevalence of amoebic liver abscess in the State of Sonora performed from 2000 to 2005. During the period we recorded 319 Amoebic Liver abscess patients (ALA) with an incidence rate of 1.19 cases per 1000 hospital discharges. This disease affects preferment to adult male individuals. The cases we report are also adult males, however we recorded 4 cases of re-incidence and all were female infants.

Based on the high incidence of ALA detected in our work, we decide to make the estimation of prevalence of infection in the population in Hermosillo Sonora abstaining a prevalence rate of 7% for *E. histolytica*/*E. dispar* complex in the microscopic examination, however the major number of infected individuals were parasitized by *E. histolytica* specie.

The second phase of the present work was a transversal descriptive study. In this phase we analyzed asymptomatic cysts passers of *E. histolytica* or *E. dispar* species, both characterized by PCR using specie specific primers. We also studied the polymorphism of the isolates obtained from the already mentioned asymptomatic cyst passers, patients of ALA; the material analyzed in these patients was obtained through the hepatic drainage of the amoebic abscess. We also analyzed feces samples from diarrhea cases in children. DNA was extracted from each type of samples, the DNA genes or regions studied were the Chitinase gene and some loci of the inter-genic regions associated to tRNA.

Polymorphism analysis of isolate suggest that there is significant degree genetic diversity in both *E. histolytica* and *E. dispar* species as was reported by a number of author all over the world; however we have to emphasize that it seems to be an association between the genotype of the strains and the outcome of *E. histolytica* infection. The genotype of the strains of this parasite detected in our study, are coincident with those previously reported in ALA patients or dysentery cases in other endemic areas around the world. We also shown a case of ALA patient who developed two independent amoebic liver abscesses, one located in the right and one in the left hepatic lobules, the analysis of polymorphism of the respective aspirated material demonstrated different *E. histolytica* genotype, the previous suggest that the *E. histolytica* inoculums in this patient was genetically heterogeneous, this is the one more evidence of the complexity of *Entamoeba* infection in the human host.

ANTECEDENTES

La amibiasis se define como la infección producida por el parásito protozoario *E. histolytica*. Las manifestaciones clínicas más comunes de la infección amibiana son la disentería y el absceso hepático amibiano, aunque también se pueden presentar infecciones en pulmón, corazón y cerebro [1, 2]. El absceso hepático amibiano (AHA) es la forma extra-intestinal mas frecuente de la amibiasis invasora.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la amibiasis como la segunda causa de muerte debida a parásitos en el mundo [3-7]. Se calcula que este protozoario infecta aproximadamente 500 millones de personas en el mundo, causando 50 millones de casos de amibiasis invasiva y aproximadamente 100,000 muertes anuales debidas a complicaciones por la enfermedad [6, 8-11]. En México, de acuerdo con un estudio seroepidemiológico relativamente reciente, se encontró que el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amiba, lo que demuestra la alta frecuencia del parásito en nuestro medio [12].

Aproximadamente 10% de las infecciones culminan en un proceso invasivo, mientras que el otro 90% de los individuos infectados cursan como portadores asintomáticos y excretarán quistes tetranucleados en las heces. En estos individuos se pueden encontrar anticuerpos anti-amibianos en el suero, pero no presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad [13, 14]. Los mecanismos

moleculares que regulan el proceso de invasión amibiana y la patogénesis aún no están bien definidos.

Una de las primeras descripciones del protozoario causante de la amibiasis la realizó Fedor Lösch en 1875. Lösch observó muestras disentéricas de un paciente y encontró una gran cantidad de amibas, a las que llamó *Amoeba coli*. Tiempo después Schaudinn lo renombró *Entamoeba histolytica* por su capacidad de causar lisis en los tejidos [15]. A principios del siglo XX era claro que algunas personas que excretaban quistes de "*E. histolytica*" no presentaban síntomas de enfermedad. En 1913 Walker y Sellards demostraron que algunos quistes aislados de personas asintomáticas podían causar enfermedad cuando personas voluntarias los ingerían [15]. Sin embargo, no era posible distinguir entre quistes patógenos y no patógenos. En 1925, Emile Brumpt sugirió que existían dos tipos indistinguibles de amibas, una capaz de invadir los tejidos del huésped y otra un simple comensal. No fue sino hasta 1993, cuando Clark y Diamond basándose en evidencias bioquímicas, inmunológicas y genéticas demostraron que existen dos especies diferentes de *Entamoeba*: *E. histolytica* con capacidad invasiva y responsable de la amibiasis, y *E. dispar*, la cual es inocua y que hasta este momento no se ha demostrado que produzca lesiones en los tejidos del huésped [16].

La infección intestinal por *E. histolytica* resulta de la ingestión de quistes, los cuales son resistentes al pH ácido del estómago; después, en el intestino grueso el parásito se desenquista generando los trofozoítos los cuales colonizan la mucosa intestinal del colon.

El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito por Dobell en 1928. Analizó el ciclo de vida en base a cuatro formas sucesivas: el trofozoíto es la forma vegetativa del parásito, el prequiste en el que se observa un solo núcleo e inicia la síntesis de la pared, el quiste maduro que es la etapa infectiva y la amiba metacística que da origen a los nuevos trofozoítos (Figura 1). Los trofozoítos se multiplican en la luz intestinal por división binaria y se enquistan, produciendo a su vez quistes tetranucleados. De cada quiste maduro se producen cuatro trofozoítos uninucleados [17].

E. histolytica puede estar en el intestino humano incluso durante años como una infección asintomática. Hasta el momento se desconocen las señales que determinan la expresión de virulencia en *E. histolytica*, que en el huésped humano darían como consecuencia la manifestación del daño tisular a nivel intestinal o extra intestinal. En áreas endémicas el AHA ocurre aproximadamente en el 2% de los pacientes infectados con *E. histolytica*, siendo 10 veces más frecuente en adultos que en niños [18, 19]. Aunque el AHA es letal sin una terapia farmacológica adecuada, la mortalidad a nivel mundial ha disminuido en las últimas décadas [20]. Lo anterior puede estar relacionado con la mejora de la calidad en los servicios generales de las comunidades urbanas y al fácil acceso a drogas antiamibianas en algunas áreas donde las parasitosis intestinales son particularmente frecuentes. Sin embargo, la reinfección en áreas endémicas es común debido a la constante reexposición al parásito. Son escasos los reportes de reincidencia de AHA, reportes aislados mencionan la reincidencia de AHA con un 0.04% en pacientes de AHA por año [5, 21]. Al respecto se ha reportado el caso de un

paciente de la ciudad de México con una triple reincidencia de AHA en un período de 4 años [5].

El diámetro de los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* varía de 20 a 40 μ m y se caracterizan por una rápida locomoción (deslizamiento) gracias a pseudópodos bien definidos. El citoplasma posee vacuolas digestivas. Los trofozoítos pueden fagocitar glóbulos rojos, leucocitos y bacterias tanto patógenas como no patógenas [22]. En el citoplasma se observan también cuerpos cromatoides, sin embargo, no tiene mitocondrias clásicas, ni retículo endoplásmico rugoso o aparato de Golgi estructurado. El núcleo es esférico y mide entre 4 a 7 μ m de diámetro, éste consiste en una membrana acromática alineada usualmente por una capa de pequeños gránulos de cromatina de tamaño regular muy compacta. El núcleo también presenta un cariosoma localizado a menudo en el centro, rodeado por una estructura acromática (Figura 2) [22].

La forma de resistencia del parásito es el quiste maduro el cual es esférico y mide entre 10 y 16 μ m de diámetro, posee cuatro núcleos idénticos a los del trofozoito. La pared de los quistes está constituida principalmente por celulosa y está estructurada a base de quitina lo que le confiere la capacidad de resistir la digestión gástrica por lo que ésta es la forma infectante del parásito (Figura 2) [16, 22].

Desde hace varios años se han realizado estudios sobre el genoma de *E. histolytica* lo que permitió determinar que sus cromosomas no se condensan en

la forma típica y que su tamaño varia de 0.3 a 2.2 Mb, aunque se han reportado diferencias en el tamaño de cromosomas homólogos a partir de distintos aislados [23]. De igual forma se determinó que el parásito posee un genoma haploide de aproximadamente 24 Mb [24]. Sin embargo, existe incertidumbre sobre su ploidía y por lo tanto del número exacto de sus cromosomas (al menos 14) [25]. Actualmente no se ha logrado entender totalmente la organización de los cromosomas en la amiba; sin embargo se conoce que los genes para RNA de transferencia (tRNA) son excepcionalmente abundantes, constituyendo el 10% del genoma amibiano (4500 copias, 10 veces mas que en el genoma humano) y los cuales poseen una organización única en el genoma [26, 27] Recientemente se concluyó con la secuenciación del genoma de *E. histolytica* lo que es un avance importante en el conocimiento de este parásito [28]. El proyecto del genoma de la amiba ha permitido conocer entre otras cosas, que su genoma está constituido por 9938 genes con un tamaño promedio de 1.17 Kb, que solo el 25% de los genes contiene intrones y que solo una cuarta parte de éstos son múltiples. El conocimiento del genoma de *E. histolytica* abre nuevos campos para el estudio de este parásito [29, 30]. De igual manera, se han hecho estudios para determinar los mecanismos que utiliza el parásito para invadir y causar daño tisular en el huésped. Sin embargo, a pesar de que se ha progresado mucho en este sentido, todavía no se conocen con precisión los mecanismos y el desarrollo de los eventos que ocurren desde la colonización hasta la producción de necrosis tisular como en el caso del absceso hepático amibiano [31, 32].

En *E. histolytica* se han identificado segmentos repetidos en tandem en

algunos genes polimórficos, como los que se encuentran dentro de los genes que codifican para la quitinasa [33] y la proteína rica en serina [34] ó los genes que no codifican proteína, como el gen específico de especie [35], las cuales han mostrado ser útiles en la identificación de variantes dentro de *E. histolytica* y *E. dispar* [36, 37].

La proteína rica en serina (SRPEh) es un antígeno de superficie inmunodominante que contiene octapéptidos y dodecapéptidos repetidos en tandem [34]. Se han determinado variaciones en secuencia y en el número de de repeticiones entre diversas cepas de *E. histolytica* [36-40]. En Bangladesh se realizó un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción en muestras de pacientes con amibiasis invasora, encontrando patrones diferentes entre cepas aisladas de pacientes con amibiasis intestinal y aquellas de pacientes con amibiasis extraintestinal [38].

El gen que codifica para quitinasa se expresa solamente durante el enquistamiento de la amiba. Los productos de PCR muestran una limitada diversidad en tamaño pero una amplia diversidad en secuencia [33, 37, 39, 40].

Son pocos los genes que no codifican para una proteína y se han utilizado para analizar la variación intra e interespecie. El ácido ribonucleico ribosomal (RNAr) está presente en los sitios altamente repetitivos del DNA circular extracromosomal, de un tamaño de 25 Kb y 200 copias por genoma. El gen específico de especie (SSG) ha sido descrito en la región río arriba del rDNA. El SSG contiene repeticiones en tandem y los productos de PCR muestran

variación en el número de repeticiones entre diferentes cepas de *E. histolytica* [36]. En algunas cepas de *E. histolytica* esta región del DNA circular no se ha detectado y en *E. dispar* no existe.

Los genes para el tRNA contienen de 71 a 87 pares de bases (pb) de longitud y son ricos en G y C. Están organizados en tandem [41], con regiones intergénicas ricas en A y T (80%) y contienen repeticiones en tandem (STRs). Se han identificado 25 distintos arreglos (unidades transcripcionales) los cuales están compuestos por unidades repetidas en tandem que codifican entre 1 a 5 tRNA. 3 de estos arreglos también codifican para 5SRNA y 1 codifica además otro RNA (snRNA). Las regiones intergénicas de estos genes contienen estructuras complejas compuestas de pequeñas secuencias repetidas en tandem (STR) que varían en tamaño (7-12 pb), aunque algunos pocos son de mayor tamaño (44 pb). Actualmente se está investigando la organización de estos genes en diversos aislados de *E. histolytica* [41]. Además, estos STR se están utilizando para diferenciar entre loci y los microsatélites de otros organismos [42]. Zaki y Clark, 2001, caracterizaron el locus 1-2 (ahora conocido como locus D-A) y locus 5-6 (locus I-W). En estos loci polimórficos se encontró que contenían genes para tRNA (Clark, datos aún no publicados).

La diversidad en estos loci entre diferentes cepas de *E. histolytica* se debe principalmente a la variación en el número de STRs [42]. Los Loci 1-2 (D-A) y el 5-6 (I-W) contienen dos bloques de STR localizados en sitios diferentes pero relacionados con las secuencias repetidas en tandem [43].

El contenido de genes en las unidades transcripcionales para tRNA en *E. histolytica* y *E. dispar* es idéntico, la única diferencia es que en los aislados de *E. histolytica* existen 2 versiones distintas de arreglos que contienen Asn^{GTT} (gen NK1) y Lys^{CTT} (gen NK2), los cuales difieren completamente en las regiones STR y en otras secuencias intergénicas [44]. En el caso del genoma de la cepa de *E. dispar* SAW760 se han encontrado 24 arreglos y todos son del tipo “NK”. El grado de similitud en la organización de estos arreglos refleja la relación filogenética de las especies, aunque su función aún no se conoce.

En la actualidad existen ya algunos reportes enfocados a la búsqueda de asociaciones entre los distintos marcadores que permiten identificar genotipos o variantes genéticas de *E. histolytica* y las diversas manifestaciones clínicas de la infección. [38, 40, 45].

A la fecha se han registrado los diversos tipos o patrones de cada uno de estos genes polimórficos; encontrando hasta la fecha 10 tipos de secuencias diferentes para el Locus 1-2 (actualmente denominado D-A) designados tipo A al tipo J, dependiendo del número de repeticiones en tandem y su distribución. Del Locus 5 y 6 (actualmente denominado I-W) se han reportado 13 tipos de secuencias diferentes (A4, A5, A5v, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A13, B, C, Cv). Dentro de la región intergénica del Locus S^{TGA}D se han identificado 17 tipos de secuencias (1SD-17SD) de 128 regiones intergénicas secuenciadas. Estos se caracterizan por presentar 2 bloques (A y B); el bloque B consiste de 8 bases que pueden estar presentes de 2 a 3 copias en este bloque. El bloque A,

muestra una mayor variación, en éste se encontraron 2 grupos diferentes de 9 bases del primer grupo de bases se ha encontrado de 3 a 9 copias localizadas al inicio del bloque A y el segundo grupo consta de una a dos copias al final del mismo. Respecto a la SREHP y quitinasa se han documentado 20 (tipo A al T) y 6 (tipo A al F) diferentes tipos respectivamente [39].

En México, no existe un registro de variantes de *E. histolytica* aisladas de las diversas regiones del país. El hecho de poder contar con estudios de este tipo nos permite comparar las cepas encontradas en nuestro país con las que se están estudiando en otros países, con el objeto de analizar la posible asociación entre el tipo de cepa *E. histolytica* con las manifestaciones clínicas en el huésped humano.

En este trabajo mostramos los resultados de un estudio retrospectivo realizado del año 2000 al 2005, de la prevalencia de AHA en el Estado de Sonora, así como la genotipificación de las de cepas de *E. histolytica* identificadas en esta región. Además, realizamos un análisis comparativo con los resultados obtenidos en regiones geográficas endémicas fuera del territorio nacional.

Por otro lado, mostramos algunas peculiaridades encontradas en nuestro estudio no reportadas hasta ahora en la literatura relacionada con la amibiasis, que, aunque preliminares, podría llevarnos a reconsiderar las características ecológicas del parásito en la naturaleza y las fuentes de riesgo de infección.

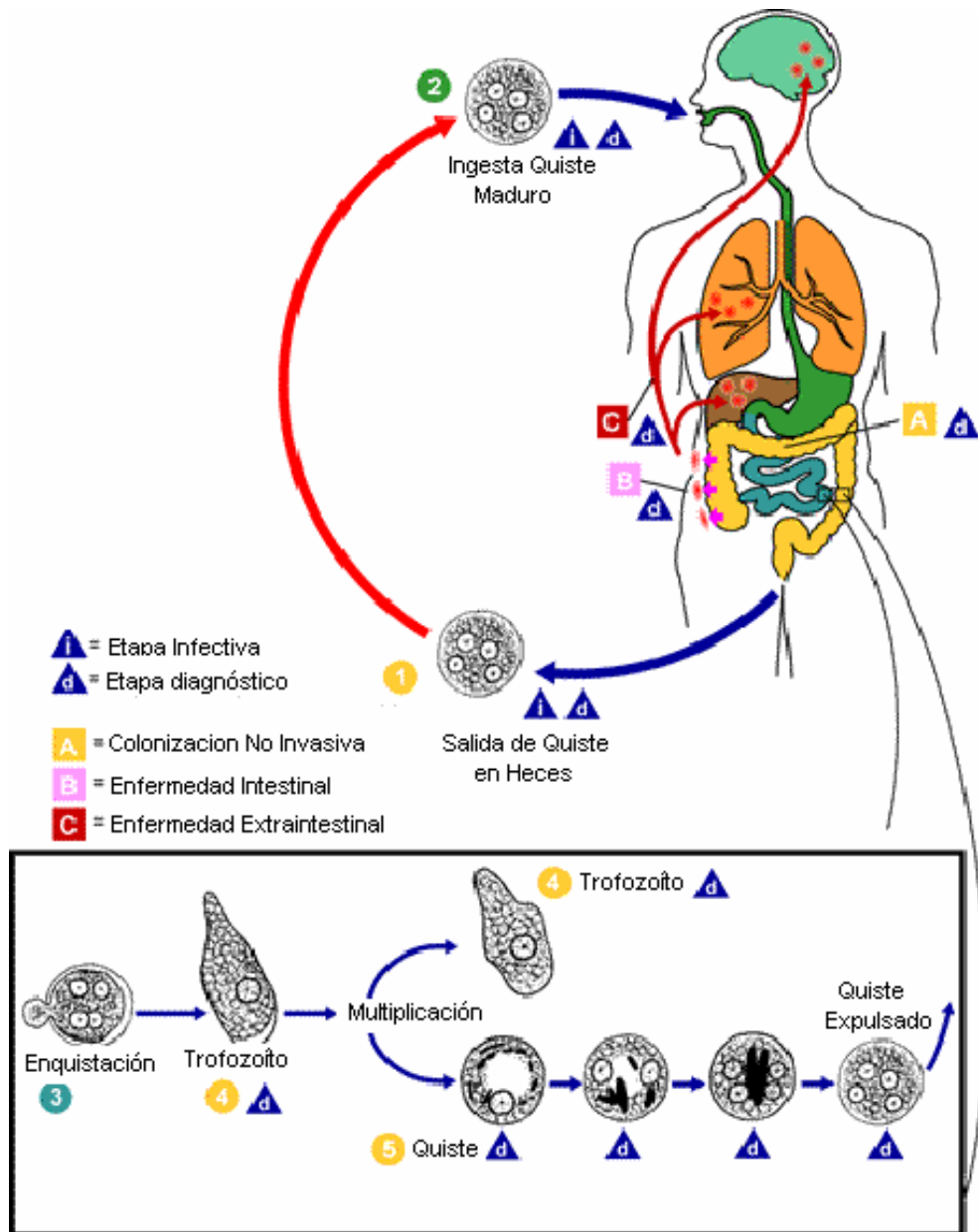


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica/dispar*.

www.telmeds.org/AVIM/Apara/amebas/Entamoeba/images_Ehistolytica/Amebiasis_LifeCycle.gif



Figura 2. Trofozoíto y quiste de *Entamoeba histolytica/dispar*

www.telmeds.org/AVIM/Apara/amebas/Entamoeba/images_Ehistolytica/Amebiasis_LifeCycle.gif

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en una primera fase, la morbilidad por absceso hepático amibiano en el Estado de Sonora en el período 2000-2005; mediante el cálculo de la incidencia de egresos hospitalarios debido a absceso hepático amibiano en la entidad. En la segunda fase del trabajo, el objetivo fue analizar el polimorfismo del gen para la CHI de *E. histolytica* y de algunos locus intergénicos asociados a genes para tRNA en el Estado de Sonora, con el objeto de estudiar la posible asociación de las variantes genéticas del protozoario y las formas clínicas de la infección.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la morbilidad por AHA en el Estado de Sonora.
- Caracterizar el polimorfismo de las regiones altamente polimórficas del gen de la CHI y de los segmentos Locus Hsp1-2,.SQ, S^{tg}aD .intergénicos asociados a los genes para tRNA de *E. histolytica* de pacientes con amibiasis invasiva y portadores del parásito asintomáticos.
- Establecer la existencia o no de asociación entre el genotipo encontrado en los aislados estudiados y la forma clínica de infección.

HIPÓTESIS

La diferencia de la capacidad de producir enfermedad (patogenicidad) en la especie *E. histolytica*, podría estar parcialmente relacionada con la variabilidad genética del parásito. Dicha variabilidad expresada como genotipo podría ser utilizada como indicador predictivo de la forma clínica de amibiasis en el hospedero humano.

MATERIAL Y METODOS

Protocolo. El presente trabajo consiste en 2 diseños independientes: un estudio retrospectivo de casos de AHA en el estado de Sonora 2000–2005 y un estudio transversal descriptivo, en donde se caracterizaron genotípicamente las cepas de amiba identificadas tanto en muestras clínicas como en portadores asintomáticos.

Para acceder a los archivos y las muestras de pacientes diagnosticados con amibiasis intestinal invasiva (AII) y AHA, se estableció una colaboración con los siguientes hospitales: El Hospital del Instituto de Seguridad Social de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), el Hospital General del Estado de Sonora (HGES), el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), el Hospital Regional Zona 2 del Instituto Mexicano del Seguro Social (HRZ2-IMSS) y el Hospital de Ginecopediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social (HGP-IMSS). Inicialmente se revisaron los archivos de cada uno de los hospitales incluidos en el estudio. Para la búsqueda de casos de pacientes con diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano, se revisaron las fichas de registro según la Codificación Internacional de Enfermedades (CIE-10).

Se contabilizaron todos los pacientes con diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano que requirieron hospitalización por el padecimiento o por reincidencia en los cinco centros de salud antes mencionados, recolectándose los datos relacionados a edad, género y fecha de ingreso. El análisis estadístico se realizó con base en los resultados obtenidos de este estudio

mediante métodos descriptivos con la ayuda del programa SPSS 10 (Statistical Analysis Software, Predictive).

Para el estudio transversal descriptivo, se analizaron muestras de individuos portadores asintomáticos (PORT) así como los pacientes que ingresaron a los hospitales con un diagnóstico de All o AHA. Los pacientes fueron entrevistados y en todos los casos se explicó el propósito del estudio y las personas que decidieron participar firmaron una carta de consentimiento informado. El protocolo de investigación fue previamente aprobado por los comités de ética de los hospitales participantes.

Muestreo. A los PORT incluidos en el estudio se les pidieron 3 muestras de heces de días consecutivos que se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento. La presencia de parásitos se determinó por análisis microscópico directo de la muestra de heces, teñida con una solución de yodo al 4%. Posteriormente, los quistes se concentraron por flotación mediante la técnica de Faust-Ferreira. Una parte del material obtenido de este último procedimiento se tiñó con yodo y se analizó microscópicamente para identificar los quistes presentes. La otra parte del sedimento se guardó en refrigeración hasta su utilización en la extracción del ADN.

A los pacientes con All se les recolectó una muestra de heces, la cual se procesó para la detección de la lectina amibiana (Tech-LabII), una vez que la muestra dió resultados positivos se procedió a la extracción del ADN.

En los casos en que fue necesario, de acuerdo al criterio del grupo de médicos

encargados de los pacientes con absceso hepático, el absceso fue drenado por personal de cirugía del hospital. Una porción del material colectado se utilizó para extracción del ADN y el resto del drenado se congeló.

Faust-Ferreira. Se tomaron aproximadamente 4 gramos de muestra fecal, homogenizando con solución salina (SS) al 0.85%, el filtrado se pasó a un tubo cónico de propileno y se llevó a un volumen de 50 ml, se centrifugó a 16,000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se repitió una vez más el mismo procedimiento. El sedimento se resuspendió en una solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) con una densidad de 1.18° Baume (aproximadamente al 35%), agregando primero 30 ml y posteriormente se le introdujo la campana de Faust-Ferreira y se llevó a un volumen de 50 ml, se centrifugó nuevamente por 5 minutos por 16,000 g. El material obtenido se lavó mediante centrifugación con solución salina 0.15 M, recuperando siempre el sedimento, hasta que el sobrenadante fue claro. Una muestra de este último sedimento se tiñó con yodo y se analizó microscópicamente para identificar los quistes presentes. La otra parte del sedimento se guardó en refrigeración hasta su utilización en la extracción de ADN.

Extracción del ADN. Se colocaron 200 μ l (quistes o heces de pacientes con All) en tubos Eppendorf de 2 ml, resuspendidos en 1.4ml de la solución de lisis (ASL), y se mezcló en vortex por 1 min. En el caso de los quistes y las heces, los tubos fueron sometidos a 5 ciclos de congelación y descongelación (-70 °C y baño María a ebullición), se centrifugaron por 16,000 g por 1 min. Se pasaron 1.2 ml del sobrenadante a otro tubo de 2 ml, se adicionó una tableta Inhibitex y se mezcló de inmediato en vortex por 1 min, se incubó 1 min a temperatura

ambiente, posteriormente se centrifugó 3 min por 16,000 g. Se transfirió todo el sobrenadante a otro tubo de 1.5 ml y se centrifugó 3 min por 16,000 g. En otro tubo de 1.5 ml se colocaron 15 μ l de proteinasa K, se adicionaron 200 μ l del sobrenadante del paso anterior, se adicionaron 200 μ l de amortiguador AL, se mezcló en vortex 15 seg, se calentó a 70 °C por 10 min, se centrifugó por 1 min por 16,000 g y se le adicionaron 200 μ l de etanol absoluto, se mezcló en vortex y se centrifugó 1 min a 16,000 g. Se transfirió todo el sobrenadante a la columna QIAamp spin (Qiagen Inc, Valencia CA), se centrifugó 1 min por 16,000 g. Se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionaron a la columna 500 μ l de amortiguador AW1, a continuación se centrifugó 1 min a 16000 g. Se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionaron a la columna 500 μ l de amortiguador AW2, y se centrifugó 3 min por 16,000 g. Se cambió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 200 μ l de buffer AE, se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min por 16,000 g, se eliminó la columna y se guardó el ADN filtrado a -20 °C.

Los aspirados de absceso hepático se procesaron directamente con el equipo de extracción de ADN QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia CA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el ADN obtenido y una serie de iniciadores seleccionados, se realizaron amplificaciones mediante PCR en mezclas de reacción de 20 μ l, con el fin de identificar y caracterizar a la especie de amiba presente. Los iniciadores que se utilizaron fueron: RD, Psp, NPsp, CHI, Hsp 1-2, S^{tg}D, SQ (Tabla 1).

TABLA 1
Iniciadores utilizados

Iniciador	Secuencia
RD5	GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA
RD3	GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC
Psp5	GGCCAATTCATTCAATGAATTGAG
Psp3	CTCAGATCTAGAAACAATGCTTCTC
NPsp5	GGCCAATTTATGTAAGTAAATTGAG
NPsp3	CTTGGATTTAGAAACAATGTTTCTTC
Hsp 1-2 (Locus 1-2 Eh)	GAG TTC TCT TTT TAT ACT TTT ATA TGT T ATT AAC AAT AAA GAG GGA GGT
S ^{tg} D-H5/H3 (tRNA Eh)	AAA TCC TGC CAC TGT CGT AA AAT CCC CGT TGA AGA GTT CT
SQ 5/H3 (tRNA Eh)	GTG GTC TAA GGC GTG TGA CT GTG GGA CCA CTT TTT ATA CCT A
CHI5	GAAS* AACAGAAGGAACACCAGG
CHI3	GGGAY ⁺ ACTAACTTCTGGCTCAG
CHIEh5	GGAACACCAGGTAAATGTATA
CHIEhEd3	TCTGTATTGTGCCCAATT
CHIEd5	GGAACACCAGGTAAATGCCTT
CHIEhEd3	TCTGTATTGTGCCCAATT
CHI5	GAAS* AACAGAAGGAACACCAGG
CHIEhEd3	TCTGTATTGTGCCCAATT

* S = C + G

+ Y = C + T

Los iniciadores RD son inespecificos y amplifican un segmento de 1950 pb tanto en *E. histolytica* (cepa HM1:IMSS) como en *E. dispar* (cepa SAW760 RR) que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal [46]. Los

iniciadores Psp son específicos para *E. histolytica*, mientras que los iniciadores NPsp son específicos para *E. dispar* [46]. Ambos iniciadores generan un segmento de 876 pb que es parte del amplicón RD. Con estos 3 pares de iniciadores, las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, MgCl₂ 2mM, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.025 U/μl de polimerasa (Ampli Taq Gold Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA) y 1 μM de cada iniciador. La amplificación se realizó en un Techne termociclador (Techne TC312), con 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 55 °C y 2 min a 72 °C. Para la amplificación con los iniciadores RD se utilizaron 2 μl del ADN de la muestra; mientras que con los iniciadores Psp y NPsp se utilizó 1 μl del amplificado RD diluido 1:10.

Los iniciadores CHI amplifican un segmento del gen de la quitinasa de 319 pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS) y de 528 pb en *E. dispar* (SAW760 RR). En este caso las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada nucleótidos, 1 μM de cada iniciador, BSA 0.15 mg/ml, polimerasa 0.025 U/μl (AmpliTaq Gold Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA), con 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 67 °C y 2 min a 72 °C.

Los iniciadores CHIEh y CHIEd amplifican segmentos del gen de la quitinasa de 351 y 561 pb en *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente [37]. Con estos iniciadores, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores CHI, salvo la temperatura de alineamiento que fue de 55 °C.

Los iniciadores Hsp 1-2 amplifican un segmento del ADN del Locus 1-2 de 340

pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS)[47] . En este caso las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada nucleótidos, 1 μM de cada iniciador, BSA 0.15 mg/ml, polimerasa 0.025 U/μl (AmpliTaq Gold Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA), con 35 ciclos de 0.5 min a 94 °C, 0.5 min a 50 °C y 1 min a 72 °C.

Los iniciadores S^{tg}aD-H5/H3 amplifican un segmento del tRNA de 220 pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS) [44]. Con estos iniciadores, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores Hsp1-2, salvo la temperatura de alineamiento que fue de 58 °C.

Los iniciadores SQ 5/H3 amplifican un segmento del tRNA de 360 pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS) [44]. Con estos iniciadores, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores NK2-H5/H3, salvo la temperatura de alineamiento que fue de 55 °C.

En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 10 min a 94 °C y al finalizar los 35 ciclos se dio otro ciclo de 8 min a 72 °C. Los productos de PCR se identificaron y analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0 % en presencia de bromuro de etidio para su visualización y se fotografiaron para tener su registro.

Secuenciación. Los productos de PCR se procesaron mediante el protocolo de GFXTM PCR DNA and gel band purification kit, de QIAGEN. Una vez purificados y cuantificados se secuenciaron mediante el método de Sanger, en el laboratorio de la Universidad de Arizona (Genomic Análisis and Technology

Core; GATC). Las secuencias obtenidas se analizaron, alinearon y compararon con secuencias ya reportadas en la literatura.

RESULTADOS

Estudio Retrospectivo de AHA en el Estado de Sonora.

Como anteriormente se mencionó, este trabajo se realizó en dos etapas, la primera corresponde al estudio retrospectivo de la incidencia de egresos hospitalarios debidos a absceso hepático amibiano que se llevó a cabo en los principales Hospitales del Municipio de Hermosillo. Los resultados de esta fase están publicados en *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 101, No. 6, 533–538 (ANEXO I).

Hermosillo es la capital de Estado de Sonora y es en este municipio donde se brinda una tercera parte de los servicios de salud a nivel estatal, logrando captar casos no solo de Hermosillo sino también de comunidades aledañas a ésta; el 75% de los casos de AHA fueron de individuos de esta localidad y de pacientes de localidades aledañas (Empalme, Santa Ana, Ures, Bacanora) que buscaron atención medica en cualquiera de los centros de salud involucrados en el estudio (Figura 3).

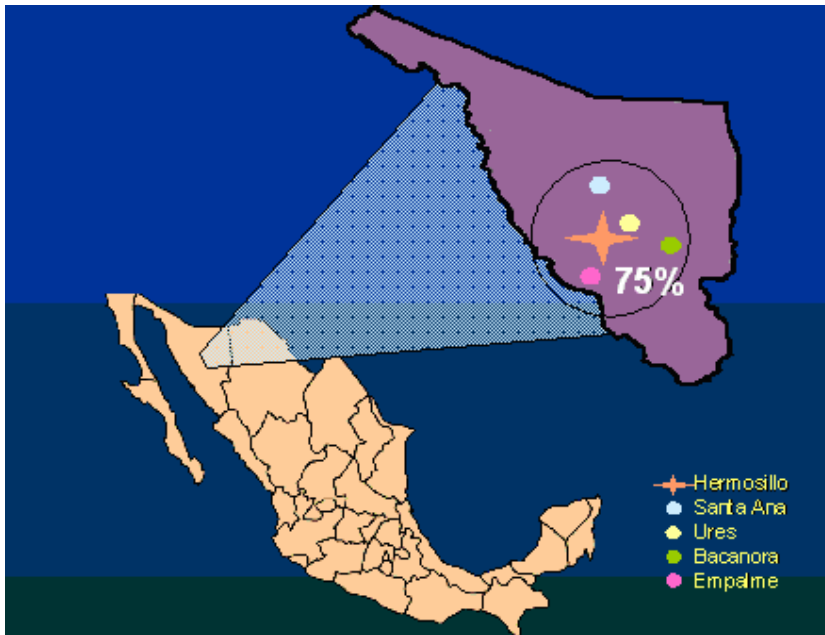


Figura 3. Área geográfica con el mayor número de abscesos hepático amibianos.

Al revisar los archivos y bases de datos de cada una de las Instituciones en la ciudad de Hermosillo, Sonora en el período del año 2000 al 2005, se detectaron un total de 319 casos diagnosticados como AHA en 268,923 egresos hospitalarios, con una tasa de incidencia de 1.19 casos/1000 egresos hospitalarios (figura 4).

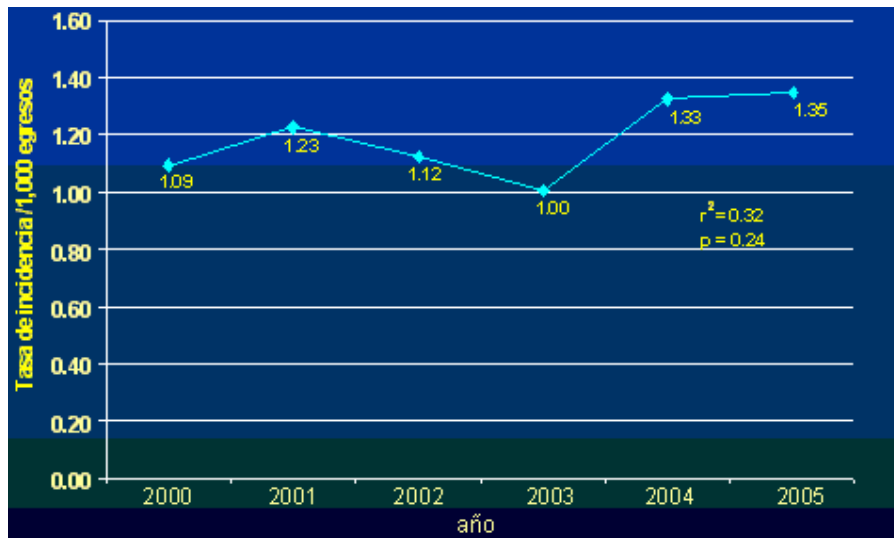


Figura 4. Tasa de Incidencia de egresos hospitalarios por AHA en Hermosillo, Sonora.

Por otro lado, en la tabla 2, podemos observar que la frecuencia del AHA ha permanecido con tasas de incidencia poblacional de 7.14 a 9.12 por cada 100,000 habitantes en los últimos años.

TABLA 2
Incidencia de AHA en Hermosillo, Sonora

Año	No. de casos	Tasa de incidencia/100,000 habitantes
2000	45	7.14
2001	54	8.4
2002	51	7.79
2003	48	7.19
2004	58	8.54
2005	63	9.12

En Hermosillo, como en otras áreas endémicas encontramos que el AHA se presenta con mayor frecuencia en el género masculino que en el femenino con una relación de 4:1 (Tabla 3).

TABLA 3
Frecuencia de AHA distribuidos por género

Género	Frecuencia casos de AHA	Porcentaje
Masculino	255	80
Femenino	64	20
Total	319	100

En la siguiente tabla se muestra la incidencia por egresos hospitalarios del absceso hepático amibiano, así como la distribución de dicha incidencia en relación a rangos de edad. La distribución de casos por edades muestra que los adultos entre 30-39 años son el grupo principalmente afectado (Tabla 4).

TABLA 4**Incidencia de egresos hospitalarios por AHA en el período 2000-2005:
distribución de incidencia según rangos de edad**

Edad (años)	Número de pacientes		Incidencia*	
	AHA	Egresos Hospitalarios (EH)	AHA/1000 Egresos Hospitalarios	Tasa de riesgo (95% intervalo de confianza)
<1	2	21,010	0.10	1.00-
1-4	15	17,024	0.88	9.26 (2.04-58.54)
5-9	7	11,793	0.59	6.24 (1.20-43.36)
10-14	8	9,727	0.82	8.64 (1.71-58.81)
15-19	12	14,380	0.83	8.77 (1.87-56.55)
20-29	67	54,659	1.23	12.88 (3.11-75.93)
30-39	75	41,504	1.81	18.98 (4.59-111.68)
40-49	65	26,367	2.47	25.90 (6.24-152.80)
50-59	39	20,119	1.94	20.36 (4.82-121.88)
60-69	18	18,217	0.99	10.38 (2.33-64.70)
>70	11	34,123	0.32	3.39 (0.71-22.10)

* ($\chi^2=57.242$; $P<0.001$).

Aparentemente el absceso hepático amibiano suele presentarse en cualquier estación del año particularmente en los adultos, a diferencia de lo que ocurre en los niños y adolescentes, en donde se presenta con mayor frecuencia durante los meses de invierno de noviembre a enero (Tabla 5)

TABLA 5
Frecuencia mensual de AHA en el período 2000-2005
en Hermosillo, Sonora

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Enero	25	7.9
Febrero	25	7.9
Marzo	31	9.7
Abril	15	4.7
Mayo	25	7.8
Junio	15	4.7
Julio	30	9.4
Agosto	32	10
Septiembre	25	7.8
Octubre	30	9.4
Noviembre	31	9.7
Diciembre	35	11
Total	319	100.0

En cuanto a la reincidencia de este padecimiento en la región encontramos un total de 4 pacientes en el periodo de 2000-2005. Estos casos constituyen el 1.25% de todos los casos de AHA. A pesar de que el absceso hepático amibiano es una enfermedad mas frecuente en el hombre adulto, las reincidencias que ocurrieron fueron en menores de edad y mujeres.

Estudio Prospectivo:

La segunda parte del estudio se hizo mediante la captación consecutiva de pacientes con diagnóstico presuntivo de absceso hepático amibiano o de diarrea con sangre (disentería) cuyas características sugerían una probable etiología amibiana, dichos pacientes se reclutaron en los hospitales ya mencionados, a través del convenio establecido con las Instituciones de Salud correspondientes, a las cuales les damos apoyo diagnóstico gratuito para la detección de anticuerpos séricos anti-amibianos (ELISA), detección de antígeno de *E. histolytica* en heces (ELISA Tech-Lab II) y detección de DNA de *E. histolytica* en productos obtenidos por punción de abscesos hepáticos y muestras de heces (PCR).

Además, con el objeto de evaluar la frecuencia de infección en la población de Hermosillo se llevó a cabo la búsqueda de portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Los individuos fueron captados en la Universidad de Sonora (UNISON) mediante un muestreo aleatorio en 109 individuos asintomáticos.

Al inicio del estudio, los individuos firmaron una carta de consentimiento de participación previo informe de propósito del estudio, la toma de muestra y el riesgo potencial. A continuación se les aplicó una encuesta sociodemográfica. Posteriormente se les solicitaron las muestras fecales de tres días consecutivos para análisis microscópico de parásitos intestinales y para la extracción de DNA, el cual se utilizó para detección y caracterización de las especies *E. histolytica* y *E. dispar*.

La identificación de parásitos intestinales se obtuvo de las 327 muestras otorgadas por los 109 individuos asintomáticos, a los que se les realizó el estudio coproparasitológico (CPS), el cual se procesó por el método Faust-Ferreira para la concentración de quistes, las muestras se analizaron al microscopio como se indicó anteriormente.

Se encontró que de las 327 muestras, 62 muestras (obtenidas de 27 individuos) revelaron la presencia de por lo menos un parásito intestinal (CPS +) (Figura 5). Los parásitos identificados en las muestras CPS +: *Endolimax nana* (13%), *Entamoeba histolytica/dispar* (5%), *Entamoeba coli* (4%), *Giardia lamblia* (3%) (Figura 6). Las muestras positivas microscópicamente se analizaron mediante PCR para la caracterización de especie (*E. histolytica* o *E. dispar*).

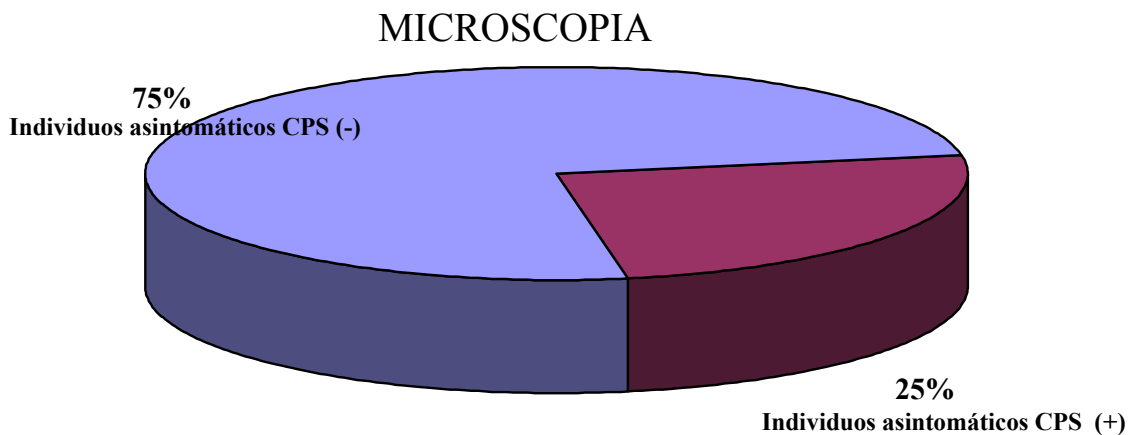


Figura 5. Resultado de los coproparasitológicos de individuos asintomáticos (Faust-Ferreira).

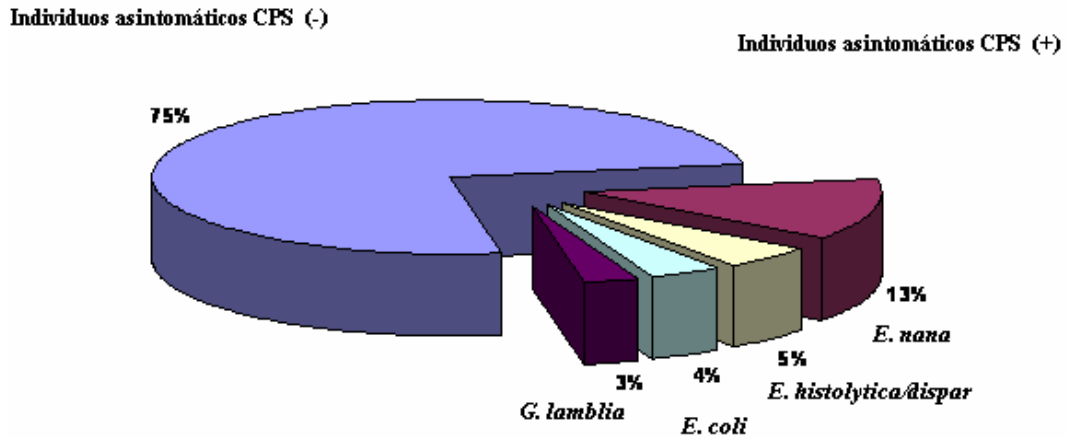


Figura 6. Distribución de los parásitos en los 27 sujetos CPS (+).

Una vez que se obtuvieron muestras con parásitos (CPS+), se prosiguió a extraer el ADN de los quistes de 20 muestras CPS (+) y de 20 muestras CPS (-). A continuación se realizó la amplificación con los iniciadores específicos para quitinasa por medio de la técnica de PCR, los fragmentos del DNA amplificado se sometieron a electroforesis en agarosa al 2%, en presencia de bromuro de etidio. Los resultados obtenidos en las 20 muestras CPS (+) fue de 4 muestras positivas para *E. histolytica* y dos muestras positivas para *E. dispar*. Por otro lado, de las 20 muestras CPS (-) se obtuvieron 4 muestras positivas para *E. histolytica* (362 pb) y una para *E. dispar* (561 pb).

Una vez identificada la especie de *Entamoeba* infectante en las muestras de

heces de PORT por PCR, se procedió a seleccionar las 7 muestras donde encontramos *E. histolytica*; a partir de éstas, se procedió con el análisis del polimorfismo de los segmentos repetidos en tandem del gen que codifica para la quitinasa, así como los STR de los genes para tRNA.

Con la utilización de los iniciadores para CHI se logró amplificar y secuenciar 20 aislados (Tabla 6 y Figuras 7-10); 7 correspondieron a portadores asintomáticos, 6 a pacientes con amibiasis intestinal y 7 a pacientes con absceso hepático amibiano. Para facilitar su análisis, las secuencias de nucleótidos (Figura 11) fueron traducidas. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 12.

Patrones o Genotipos de Quitinasas. Si analizamos las secuencias de los segmentos polimórficos de las quitinasas podemos destacar varios aspectos. De los 4 patrones obtenidos (Tabla 8), 8 son iguales (genotipo C); (presentan 8 heptapéptidos) y fueron obtenidos de 5 casos de procesos invasores: 2, 3, 4, 14, 28 y de 3 de portadores asintomáticos: Asin075, ASIN085, RO-_q. Para los casos de amibiasis extraintestinal: KAHA, AHAIZQ, A95-dH, FG-tf, A45-dp, PV-_tf, EV-_SD, A92-dH, FG-_q, A97-dH se observó un patrón específico, caracterizado por la ausencia de dos heptapéptidos (Figura 12), este patrón se reportó al Gen Bank con la clave EF445962. Es conveniente aclarar que hasta antes de este estudio, el genotipo H no había sido reportado o identificado en otra parte del mundo. Los otros 2 patrones identificados, uno corresponde al reportado para la cepa HM1 de *E. histolytica* el cual posee 8 heptapéptidos, el otro patrón resultó ser más corto y posee solo 4 heptapéptidos semejante a lo

observado en la cepa NIH-200 (genotipo F)(Figura 12, Tabla 8).

TABLA 6
Muestras analizadas

Especie	Aislado	Origen (referencia)	Muestra	Información clínica
<i>Entamoeba histolytica</i>	AII-2	HIES	Heces	Infante con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	AII-3	HIES	Heces	Infante con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	AII-4	HIES	Heces	Infante con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	AII-14	HIES	Heces	Infante con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	AII-28	HIES	Heces	Infante con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	KAHA	HIES	Aspirado de AHA	Infante con AHA
<i>Entamoeba histolytica</i>	AHAIZQ	HGES	Aspirado de AHA	Adulto con AHA
<i>Entamoeba histolytica</i>	AHADER	HGES	Aspirado de AHA	Adulto con AHA
<i>Entamoeba histolytica</i>	Asin075	UNISON	Heces	Adulto asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	ASIN085	UNISON	Heces	Adulto asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	HM1:IMSS	México	Cultivo axénico	Secuencia de referencia
<i>Entamoeba histolytica</i>	A92-dH	HGMSS	Aspirado de AHA	Adulto con AHA ^b
<i>Entamoeba histolytica</i>	A95-dH	HGMSS	Aspirado de AHA	Adulto con AHA ^b
<i>Entamoeba histolytica</i>	A45-dP	HGMSS	Aspirado Pleural	Adulto con AHA ^b
<i>Entamoeba histolytica</i>	A97-dH	HGMSS	Aspirado de AHA	Adulto con AHA ^b
<i>Entamoeba histolytica</i>	EV-(SD)	HGMSS	<i>Entamoeba histolytica</i>	Adulto con AII ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	PV-(tf)	HGMSS	Trofozoitos	Adulto Asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	FG-(q)	HGMSS	Quistes	Adulto Asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	FG-(tf)	HGMSS	Trofozoitos	Adulto Asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	RO-(q)	HGMSS	Quistes	Adulto Asintomático ^a
<i>Entamoeba histolytica</i>	RO-(tf)	HGMSS	Trofozoitos	Adulto Asintomático ^a

^aPositiva la detección de lectina amibiana (Tech Lab-II)

^bAltos niveles de anti-*Entamoeba histolytica* (ELISA: IgG sérica)

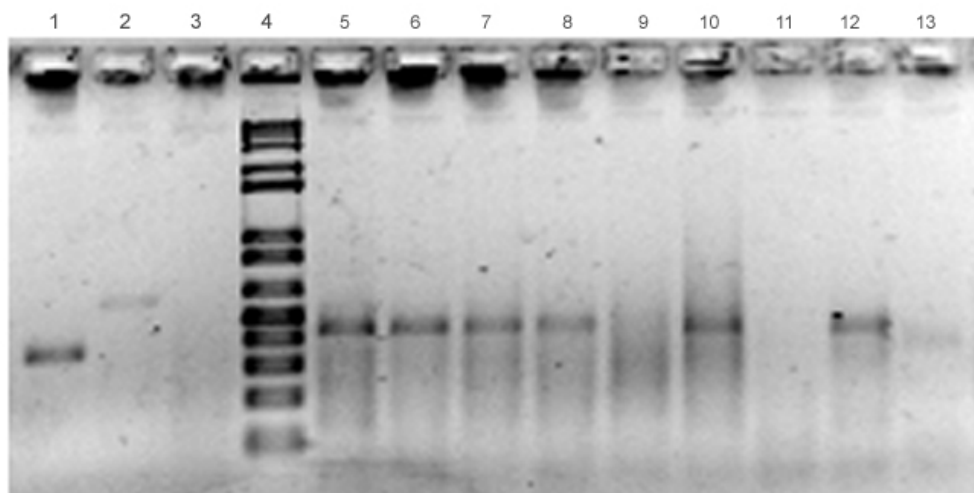


Figura 7. Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de las muestras de pacientes con All y los iniciadores CHI: carriles 1 y 2; control de *E. histolytica* (362 pb) y *E. dispar* (561 pb), carril 4; marcador pares de bases; carriles 5 -13, pacientes con All.

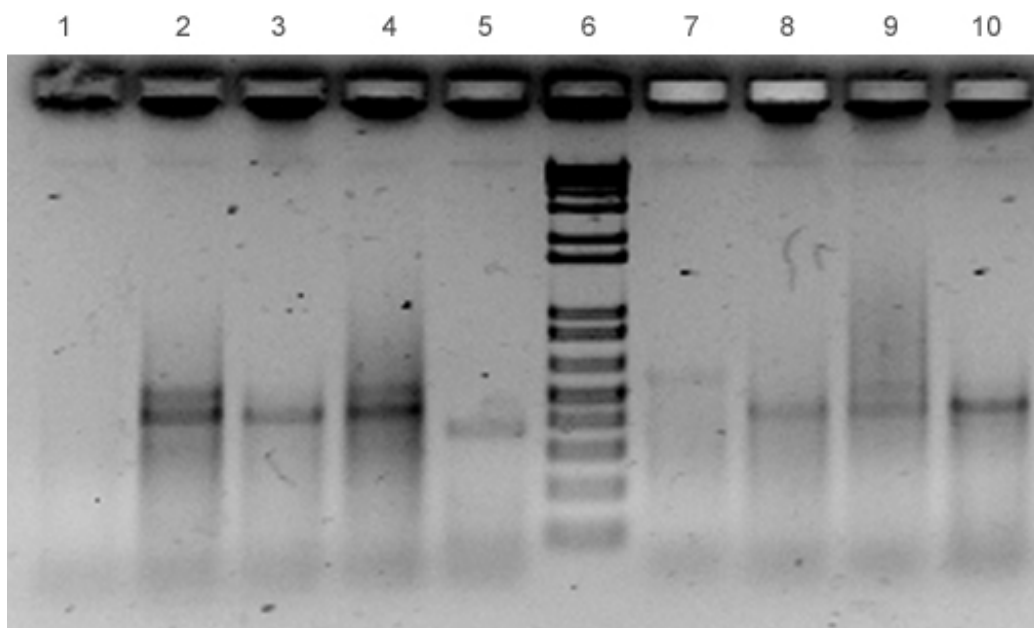


Figura 8. Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de las muestras y los iniciadores para CHI: carriles 5 y 7; control de *E. histolytica* (362 pb) y *E. dispar* (561 pb), carril 6; marcador pares de bases; carriles 2-4 y 8-10, pacientes con All. Bandas superiores son fragmentos PCR irrelevantes (verificados por la secuencia).

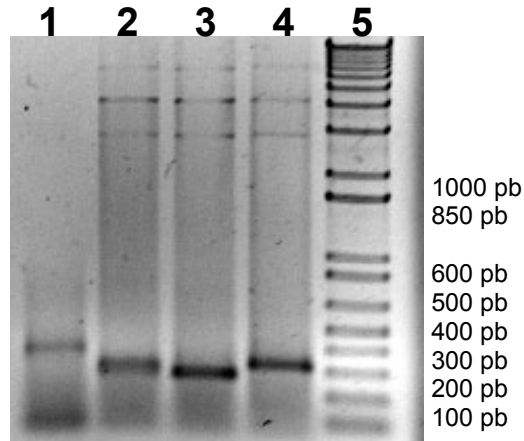


Figura 9. Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de las muestras y los iniciadores para CHI. Carril 1 control de *E. histolytica* (362 pb); carril 2, AHA; carril 3 y 4, ASINT; carril 5, marcador de pares de bases (1 Kb plus DNA ladder, de invitrogen).

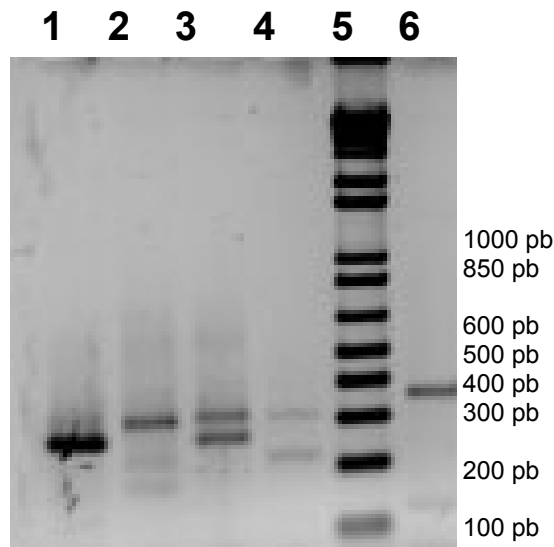


Figura 10. Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de las muestras de AHA y los iniciadores de CHI: carril 1, AHAIZQ; carril 2 y 4 ASINT; carril 3 AHAD; carril 5, marcador de pares de bases (1 Kb plus DNA ladder, de invitrogen); carril 6 control de *Eh* (362 pb).

El polimorfismo observado en las bandas que aparecen en las figuras 9 y 10, en donde se pueden ver bandas a distintos niveles en el gel, es debido a la diferencia en tamaño de los fragmentos amplificados del gen quitinasa, lo que sugiere que se trata de cepas polimórficas en el gen de quitinasa de *E. histolytica*. La secuencia de nucleótidos de estos 4 grupos y su alineamiento se muestra en la Figura 11.

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento polimórfico del gen que codifica para las quitinasas de *Entamoeba histolytica* obtenidos de los aislados.

```

U78319      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AII-3      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AII-28     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
ASIN075    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
ASIN085    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AII-14     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AII-4      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AII-2      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
RO-TF     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AHADER     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
RO-Q      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
A92-dH    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
dH-K      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGGGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
A95-dH    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
A45-dP    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
A97-dH    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
EV-SD     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
FG-TF     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
EVI-CUCI  GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
FG-Q      GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
PV-TF     GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
AHAIZQ    GAAAAAAGCCAGGTGATTTCTTTGAGAAGTCACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAA
*****
U78319      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
AII-3      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
AII-28     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
ASIN075    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
ASIN085    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
AII-14     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
AII-4      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
AII-2      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
RO-TF     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT
dH-DER    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT
RO-Q      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
A92-dH    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
dH-K      ACTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
A95-dH    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
A45-dP    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
A97-dH    TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
EV-SD     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
FG-TF     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
EVI-CUCI  TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
FG-Q      TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA
PV-TF     TCTTCTGAAATTA AACCCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAGTTAAACCA

```

```

dH-IZQ      TCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCA
              *****
U78319      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
AII-3       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
AII-28      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
ASIN075     GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
ASIN085     GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
AII-14      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
AII-4       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
AII-2       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
RO-TF       AGTATCCCAAAGAAAACAGTGGTATATAT-----
dH-DER      AGTGTCCC-----
RO-Q        GATTCTTCTGAATCTAAATATGAATCTTCTGAAATTAACCAGATTCTTCTGAATCTAAA
A92-dH      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATC-----
dH-K        GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATCCCAAGGGCGAAT
A95-dH      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATC-----
A45-dP      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATC-----
A97-dH      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATC-----
EV-SD       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATC-----
FG-TF       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATCCCAAAGAAAACA
EVI-CUCI    GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATCCCAAAGAAAACA
FG-Q        GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTAGTATCCCAAAGAAAACG
PV-TF       GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTGTAGTATCCCAAAGAAC--
dH-IZQ      GATTCTTCTGAATCTAAACATGAATCTTCTGA-----
              *      *
U78319      CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATC-----
AII-3       CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTTTAGTGTCCCAA-----
AII-28      CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAA-----
ASIN075     CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAA-----
ASIN085     CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAA-----
AII-14      CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTGTCCCAA-----
AII-4       CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAA-----
AII-2       CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAA-----
RO-TF       -----
dH-DER      -----
RO-Q        CATGAATCTTCTGAGCCAGAAGTT-AGTATCCCAAAGAAAACAGTGTATTATACTAAT
A92-dH      TCTGCAGATATCCATCACA CTGGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGC
dH-K        -----
A95-dH      -----
A45-dP      -----
A97-dH      -----
EV-SD       -----
FG-TF       GTGCTTATAAT-----
EVI-CUCI    GT-----
FG-Q        GTCGTT-----
PV-TF       -----
dH-IZQ      -----

```

* U78319, secuencia de *E histolytica* HM1:IMSS reportada en el gene bank. Eh-HM1, secuencia de *E histolytica* HM1:IMSS obtenida en el laboratorio. Pacientes: A92, A95, A45, A97, PV, FG, RO, EV. Drenado hepático (dH), drenado Pleural (dP), trofozoítos (Tf), quistes (Q), síndrome diarreico (SD), amibiasis intestinal invasiva (AII), portador asintomáticos (ASIN).

Para facilitar su análisis las secuencias de nucleótidos fueron traducidas a secuencias de aminoácidos las cuales se muestran en la figura 12.

```

A95-dH -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
4      GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
FG_tf_ -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
A45-dP -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
_Asin075 GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
3      GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEV-STI--PK
KAHA    GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFGKSPDSSSESKHETSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
14      GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
AHAIZQ  GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
2      GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
PV_tf_  -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
EV_sd_  -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
A92-dH -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
AII-28  GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
FG_g    -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
A97-dH -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--
_Asin085 GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
U78319 GTPGKICIGETVCKCG-RTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
RO_g    -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEVVKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
AHADER  GTPRKICIGESVFNAGRTQYNPCVWNFLDLPDCEKKPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--PK
RO_tf_  -----KPGDFFEKSPDSSESKHESSEIKPDSSSESKHESSE-----EIKPDSSSESKHESSEPEVSTI--

```

Figura 12. Alineamientos del fragmento de la quitinasa obtenida de los aislados.

Tomando en cuenta la estrategia utilizada por Ghosh y col. [37] a los heptapéptidos del segmento polimórfico de las quitinasas se les asignó un número (Tabla 7), el cual depende de la secuencia de aminoácidos que los constituyen, por lo que estas 20 secuencias pudieron ser ordenadas en 4 grupos o patrones distintos, los cuales se muestran en la Tabla 8.

TABLA 7
Heptapéptidos

Heptapéptidos	Identificación de los heptapéptidos
EKSPDSS	8
ESKHESSE	3
EIKPDSS	4
EVKPDSS	7

TABLA 8
Patrones de secuencias de aminoácidos en el segmento polimórfico del gen CHI, en aislados de *E. histolytica* provenientes del Municipio de Hermosillo

Aislados	Patrón de Secuencia	Genotipo	Cepas reportadas por.
2; 3; 4; 14; 28; Asin075; Asin085; RO-_q.	8-3-4-3-7-3-4-3	C	HM1:IMSS; SAW755; SAW1453; KU2; KU4; KU7; KU9; HU10; KU13; KU14; KU16; KU18; KU19; KU20; KU22; KU26; KU27; KU28; KU29; KU31; KH5 [39]
KAHA; AHAIZQ; A95-dH; FG-tf; A45-dp; PV-_tf; EV-_SD; A92-dH; FG- q; A97-dH.	8-3-4-3-----4-3 ^a		(Gen Bank EF445962)
RO-_tf	8-3-4-3-----	F	KUI, NIH:200; Eh K1 [39]
AHADER	8-3-4-3-4-3-4-3 ^a		

^a Nuevo patrón obtenido en este estudio.

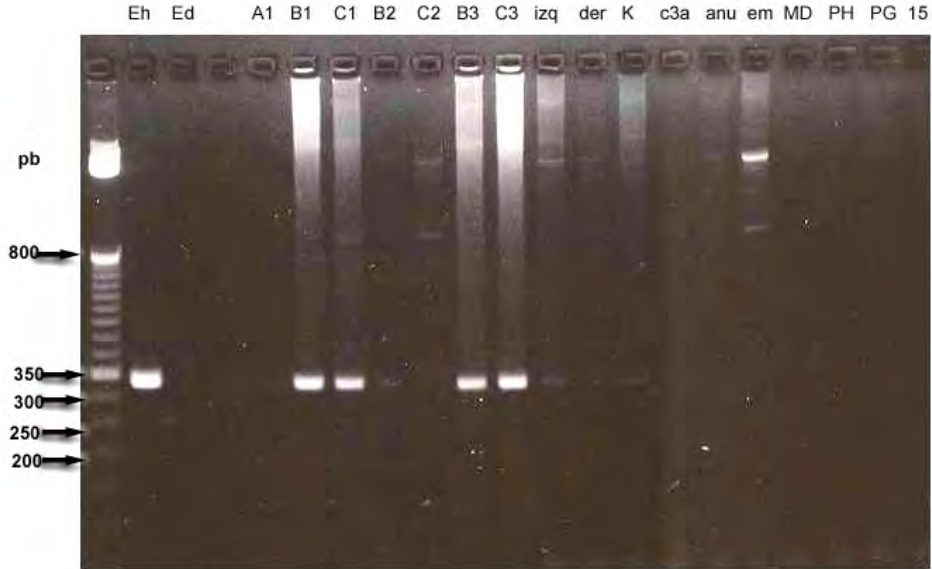


Figura 13. Amplificación del segmento Hsp 1-2 de *Entamoeba histolytica* de muestras de absceso hepático.

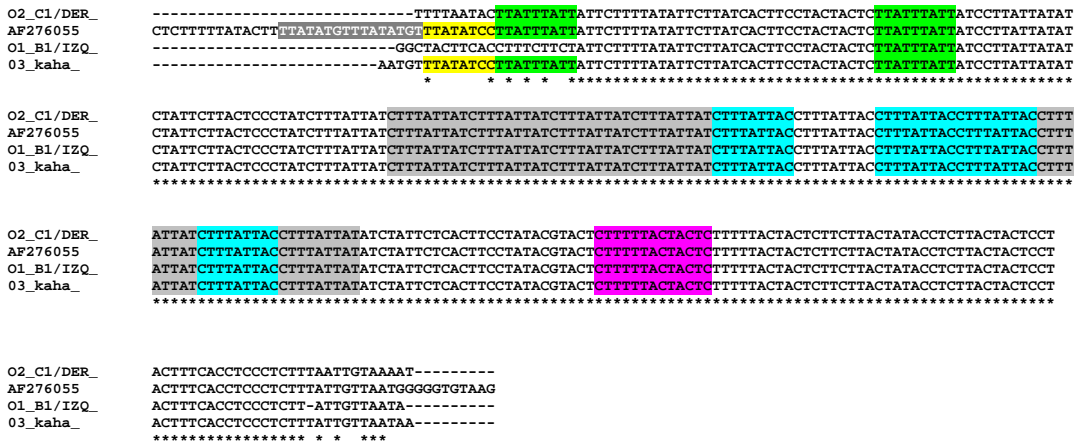


Figura 14. Alineamiento de las secuencias del producto de PCR obtenido con los iniciadores para Hsp1-2, obtenida de los aislados de AHA.

Los resultados anteriores muestran que los productos de PCR, corresponden al locus 1-2 tipo D (Figuras 13 y 14); genotipo repostado por Haghghi y sus colaboradores en el año 2002 (Gen Bank: AB075704)[39].

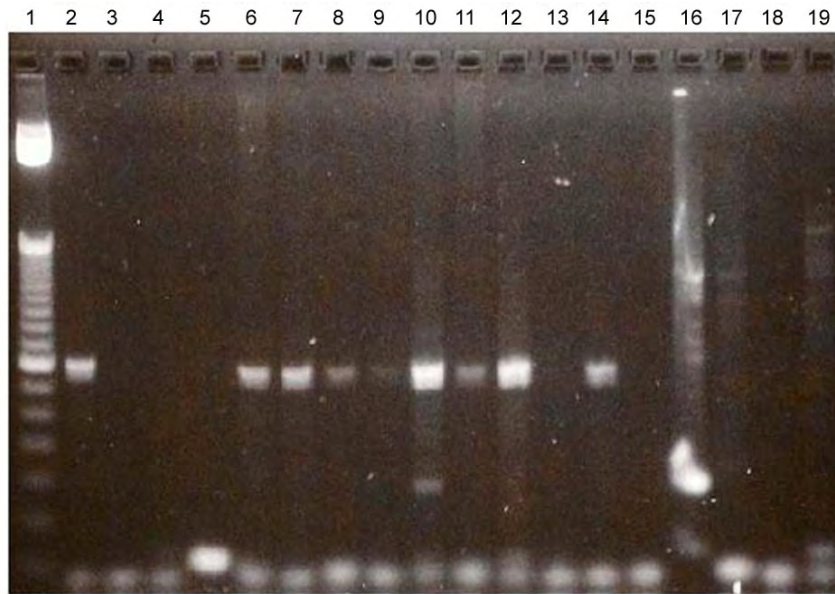


Figura 15. Electroforesis de los amplificadores obtenidos con los iniciadores para el segmento SQ de *Entamoeba histolytica* de muestras de absceso hepático. Carril 1, pb; carril 2 y 3, Eh y Ed; carril 6-14, muestras de AHA; carril 15-19, muestras de Ali.

```

O32__B1/IZQ_      -TTTGGTCTAAGGCGTGTGACTAGAAATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTTCGAATCCTGCCGTTGTCGATGTTTTTAAACATAAGGATAGATGG
AY843006.1        ---GTGGTCTAAGGCGTGTGACTAGAAATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTTCGAATCCTGCCGTTGTCGATGTTTTTAAACATAAGGATAGATGG
O35__KAHA_        -TTTGGTCTAAGGCGTGTGACTAGAAATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTTCGAATCCTGCCGTTGTCGATGTTTTTAAACATAAGGATAGATGG
O33__C1-2/DER_    CTTTGGTCTAAGGCGTGTGACTAGAAATCACTTCTCCTCTGGAGGCGTAGGTTCGAATCCTGCCGTTGTCGATGTTTTTAAACATAAGGATAGATGG
*****

O32__B1/IZQ_      ATAGATGGATATAAATATATAAGGATATAAGTATAGAGGTATAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAAGTGAATAAAGATGAA
AY843006.1        ATAGATGGATATAAATATATAAGGATATAAGTATAGAGGTATAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAAGTGAATAAAGATGAA
O35__KAHA_        ATAGATGGATATAAATATATAAGGATATAAGTATAGAGGTATAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAAGTGAATAAAGATGAA
O33__C1-2/DER_    ATAGATGGATATAAATATATAAGGATATAAGTATAGAGGTATAAAGTATAGATGTATAATACATAAGTACATATACAAAAGAAAGTGAATAAAGATGAA
*****

O32__B1/IZQ_      TAGGTATAAGTATAGGAAGTACACATAAATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATATAAATATATAATATAAATAAATAAAGAAAGATATAAGTAG
AY843006.1        TAGGTATAAGTATAGGAAGTACACATAAATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATATAAATATATAAATAAATAAAGAAAGATATAAGTAG
O35__KAHA_        TAGGTATAAGTATAGGAAGTACACATAAATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATATAAATATATAAATAAATAAAGAAAGATATAAGTAG
O33__C1-2/DER_    TAGGTATAAGTATAGGAAGTACACATAAATAAATAAAGAGAATAAGATATAAGATATAAGATATAAATATATAAATAAATAAAGAAAGATATAAGTAG
*****

O32__B1/IZQ_      TATAGATAAG
AY843006.1        TATAGATAAT
O35__KAHA_        TATAGATGGA
O33__C1-2/DER_    TATAGATGTA
*****

```

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de los fragmentos obtenidos en la PCR con iniciadores para los segmentos SQ, obtenida de los aislados de AHA.

El genotipo correspondiente a los aislamientos de los pacientes con AHA es el mismo genotipo reportado por Ali y sus colaboradores en el año 2005 (número de acceso al Gen Bank AY843006) (Figuras 15 y 16) [44].

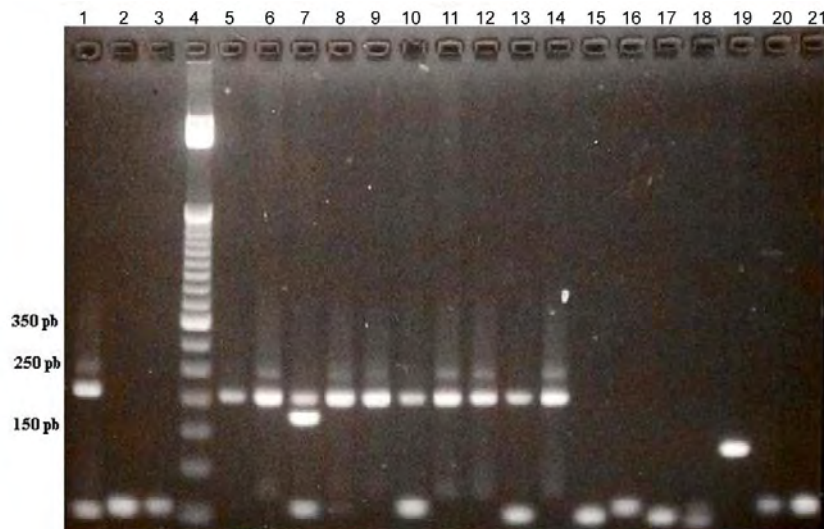


Figura 17. Amplificación del segmento S^{tga} D H3 de *Entamoeba histolytica* de muestras de absceso hepático: carril 1 y 2, Eh y Ed; carril 4, pb; carril 5-14 AHA.

```

EF421401.1|      AAATCCTGCCACTGTCGTAATCTTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA TA
O23_KAHA-1_|      AAATCCTGCCACTGTCGTAATCTTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA TA
O19_B1-1/IZQ_|      AAATCCTGCCACTGTCGTAATCTTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA TA
O22_C1-2/DER_|      -AATCCTGCCACTGTCGTAATCTTTTTATAAACATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA TA
*****

EF421401.1|      ATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA ATATAGAAA TAATAAAAAGTTATAATATAGTAAGA
O23_KAHA-1_|      ATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA ATATAGAAA TAATAAAAAGTTATAATATAGTAAGA
O19_B1-1/IZQ_|      ATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA ATATAGAAA TAATAAAAAGTTATAATATAGTAAGA
O22_C1-2/DER_|      ATAGAAA TAATAGAAATAATAGAAA ATATAGAAA TAATAAAAAGTTATAATATAGTAAGA
*****

EF421401.1|      AAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAC ATATAAGG ATATAAAC AT---
O23_KAHA-1_|      AAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAC ATATAAGG ATATAAAC ATATA
O19_B1-1/IZQ_|      AAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAC ATATAAGG ATATAAAC AT---
O22_C1-2/DER_|      AAAAAATAGTATAAT ATATAAACATATAAAC ATATAAGG ATATAAAC ATATA
*****

```

Figura 18. Alineamiento las secuencias de los fragmentos obtenidos en la PCR con iniciadores para los segmentos S^{tga} D H3, obtenida de los aislados de AHA.

En este caso los amplificadas corresponden al locus S-D del tipo 15 SD; genotipo reportado por Tawari y sus colaboradores en el año 2008 (número de acceso al Gen Bank EF421401) (Figuras 17 y 18) [41].

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que en Sonora existe una alta frecuencia de infección por parásitos intestinales ya que el 25% de los portadores asintomáticos (27 de 109 involucrados en el estudio) presentaron en el análisis microscópico al menos un parásito. Del porcentaje total de parasitosis, el complejo *E. histolytica/dispar* ocupó el segundo lugar con un 20% (5 individuos) lo cual coincide con lo obtenido por Tirado y colaboradores (2002) y por Castillo y colaboradores (2002).

La utilización de nuevas tecnologías para la caracterización de las especies *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras fecales en el humano ha demostrado la baja sensibilidad y especificidad de los diagnósticos microscópicos comparativamente a la detección de antígeno amibiano mediante la técnica de ELISA (TechLabII) o a la PCR [48-50].

De manera inversa a lo citado por Patrick Ayeh (2001) [38], en este estudio se encontró que para el caso de los portadores asintomáticos en este municipio, la infección por *Entamoeba histolytica* fue 3 veces más frecuente que con *Entamoeba dispar*. Este hallazgo apoya los resultados de reportes anteriores en el sentido de que en México la prevalencia de infección por *E. histolytica* es mas alta que por *E. dispar* [51, 52], a diferencia de lo que ha sido reportado en Suecia [53], Italia [54] y Grecia [55], Nicaragua [56], Etiopia [57] y Ghana [58], en donde la frecuencia de infección por *E. dispar* es mayor que la de *E. histolytica*. Además, algunos estudios en Durban, Sudáfrica, muestran también

que la frecuencia de infección por *E. histolytica* es mayor que la de *E. dispar* [59], algo similar sucede en Asia. En Japón, aunque no es un país endémico de amibiasis se ha observado que en ciertos núcleos de población como son las instituciones encargadas del tratamiento intra-hospitalario de personas con retraso mental, así como poblaciones de homosexuales masculinos [60-62] la prevalencia de infección por *E. histolytica* y la amibiasis invasora intestinal o extraintestinal es mas frecuente que las infecciones por *E. dispar*.

Estas diferencias que se observan en la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en diferentes partes del mundo, consideramos que obedecen a adaptaciones de los organismos (*E. histolytica*, *E. dispar* y el humano) a los distintos nichos ecológicos en las diferentes regiones geográficas.

En el Estado de Sonora del año 2000 al 2005, se detectaron 319 casos de AHA, con una tasa de incidencia de 1.19 casos por cada 1000 egresos hospitalarios. A pesar de que este padecimiento afecta preferentemente al género masculino en edad adulta y la mayoría de nuestros casos fueron varones, se registraron 4 reincidencias de este padecimiento, las cuales se presentaron en mujeres menores de edad. Actualmente son escasos los reportes de reincidencias de AHA [5, 21], como el de León (1970), quien reportó una tasa de incidencia anual de AHA del 0.04%. En base a estos antecedentes, en Sonora así como en el resto de la república, es importante actualizar los datos epidemiológicos; ya que como en este caso, el AHA puede estar subestimado, de hecho la Secretaría de Salud ha dejado de reportar la morbilidad por AHA en México a partir del año 2002

(<http://portal.salud.gob.mx/>), por considerar que dicha enfermedad en la opinión de los expertos ha dejado de ser una enfermedad relevante y no sujeta a la norma de enfermedad comunicable en país. El caso de Sonora, así como las estadísticas hospitalarias en diferentes ciudades de la República ponen en entredicho tal aseveración [63].

Uno de los aspectos biológicos con importancia epidemiológica y en la salud pública en nuestro país y otros países, considerados por la morbilidad de la amibiasis como países endémicos, es el estudio de la variabilidad genética, en particular de la especie *E. histolytica*, ya que como hemos mencionado anteriormente la existencia de casos de amibiasis invasora y de portadores asintomáticos de *E. histolytica*, nos hace pensar en la diversidad genética en esta especie.

En el presente trabajo mostramos los genotipos diferentes de los aislados de *E. histolytica* obtenidos de enfermos de amibiasis invasora (AII, AHA) y de individuos portadores asintomáticos (Tabla 8).

Aunque en el inicio de la década se había descrito claramente la diversidad o polimorfismo en diferentes genes o secuencias de DNA. Éstas habían sido probadas en cepas o aislados mantenidos en cultivo axénico, polixénico o monoxénico. De hecho la variabilidad estaba basada en uno ó dos marcadores polimórficos; sin embargo, el significado de tal polimorfismo en relación con el establecimiento de una particular forma de interacción huésped-parásito, hasta hoy no ha quedado totalmente esclarecido.

De hecho a pesar del polimorfismo de los STR de las secuencias intergénicas de los genes para RNAt [41] recientemente estudiados, existen datos que podrían apoyar su utilización como marcadores de una posible amibiasis invasora; sin embargo, en nuestra opinión los resultados publicados y nuestros resultados son sugerentes de la existencia de una asociación entre el genotipo del parásito y el resultado de la infección [38, 40, 45]. Lo anterior se basa, en el hecho de que el genotipo de *E. histolytica* identificado en las diversas muestras fue diferente para los casos de amibiasis intestinal que las de amibiasis extraintestinal. En el caso de AII, el genotipo para quitinasa identificado fue del tipo C, en contraste, a las muestras obtenidas de pacientes con AHA se les logró detectar un nuevo genotipo, cuya secuencia recientemente fue reportada por nuestro grupo con número de acceso EF445962. Ali y sus colaboradores (2008), después de analizar los genotipos identificados con 6 locis de regiones intergénicas del tRNA, encontraron una asociación entre los genotipos y el resultado de la infección, sugiriendo que no todas las cepas de *E. histolytica* tienen la misma capacidad de causar AHA [64].

En el presente trabajo encontramos que el genotipo de *E. histolytica*, obtenido en muestras de pacientes con amibiasis extraintestinal (AHA) utilizando como blanco para el análisis el locus 1-2 (actualmente locus SD), el cual se relaciona con el fenotipo D [39] resultó ser del tipo 15 SD [41]. Lo anterior corresponde a lo reportado por Ali y colaboradores (2008) quienes encontraron que de 6 muestras (4 de Bangladesh, una de Italia y una de EUA) de AHA que amplificaron con los iniciadores para este locus, las provenientes de EUA e Italia mostraron el mismo genotipo identificado en las muestras analizadas en

nuestro estudio (15SD). Cabe mencionar que una de las 4 muestras obtenidas en Bangladesh mostró este mismo genotipo [64].

Al utilizar los iniciadores que amplifican el locus SQ, encontramos que el genotipo obtenido de *E. histolytica* de estos pacientes corresponde al mismo reportado por Ali y colaboradores, cuya secuencia se encuentra reportada en el GenBank con el número de acceso AY843006 [44].

Nuestros resultados, apoyados por los obtenidos en otras comunidades endémicas, sugieren que la utilización de estos marcadores para la genotipificación de aislados de *E. histolytica* podrían predecir la consecuencia de la infección en el huésped humano, permitiendo la toma de decisiones dirigidas a la reducción de la morbilidad en comunidades con alto riesgo de infección invasora. La coincidencia de genotipos de *Entamoeba histolytica* en regiones geográficas tan distantes podría ser un indicador de la alta movilidad de cepas invasoras.

La reinfección cíclica del parásito en áreas endémicas es común debido a la reexposición al parásito. Sin embargo, son escasos los reportes de infecciones mixtas por *Entamoeba histolytica* en un mismo individuo. En el presente trabajo, reportamos el caso de un paciente con AHA múltiple, en el cual se lograron identificar 2 genotipos diferentes del gen para quitinasa, uno proveniente del material de absceso en el lóbulo izquierdo y otro obtenido en el material del absceso del lóbulo derecho. Este es el primer caso en el que se detectan 2 genotipos simultáneos en un absceso hepático amibiano múltiple.

En el caso de lo reportado por Ali y colaboradores (2008) los genotipos estudiados correspondieron a aislados de *Entamoeba histolytica* obtenidos de muestras fecales y del material de absceso hepático en el mismo paciente. Ante este hallazgo se podría especular acerca del significado de los resultados mencionados: a) El AHA puede ocurrir muchos meses después de la infección inicial, dependiendo del tamaño del inóculo recibido. Por lo que el intervalo entre el inóculo inicial y la presentación del daño en el hígado da oportunidad a que en zonas endémicas los individuos se expongan a nuevas reinfecciones, lo que explicaría la diferencia entre el genotipo de la *Entamoeba histolytica* encontrada en el hígado y la detectada a nivel intestinal. b) Otra posibilidad que por nuestra experiencia en estudios epidemiológicos, en diferentes comunidades con alta prevalencia de infección podría ser muy factible, es la existencia de nichos ecológicos con parásitos genéticamente heterogéneos: múltiples especies (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*) y variantes genéticas de ambas especies. Estos hechos se han confirmado por diferentes autores [65], quienes han documentado claramente la existencia de infecciones mixtas de *Eh* y *Ed*. Por otro lado también existe la evidencia de coinfecciones, en este caso por *Ed* con genotipos diferentes (datos no publicados). c) Otra alternativa podría ser la recombinación o reorganización del ADN del parásito la cual tendría lugar durante el proceso de migración de *Entamoeba histolytica* del intestino al hígado. En este caso los STR que se han analizado hasta ahora, existen en múltiples copias dentro de un arreglo mucho mas grande a manera de tandem, tales estructuras cromosomales se sabe son menos estables que las secuencias que se encuentran en una sola copia. Sin embargo, hasta el

momento esto último es una mera especulación que requiere estrategias metodológicas complejas para probar el fenómeno descrito.

Sin embargo, en el caso del hallazgo de 2 genotipos diferentes en el gen para la quitinasa, uno en cada uno de los abscesos hepáticos (derecho e izquierdo), este fenómeno de reorganización del DNA sería mucho menos factible, tratándose de un gen único, ya que sólo existe una sola copia del mismo en el DNA de *Entamoeba histolytica*.

Los hallazgos de Ali y colaboradores (2008) y nuestros resultados, demuestran la complejidad y heterogeneidad genética de *Entamoeba histolytica* en los nichos ecológicos en la naturaleza. Además, de resaltar la necesidad de abordar nuevas estrategias de estudio para conocer los mecanismos y las presiones de selección, que se dan en el huésped para permitir la adaptación de ciertos genotipos del parásitos en los diferentes tejidos blancos del huésped

CONCLUSIONES

- En el Estado de Sonora existe una alta incidencia de amibiasis extraintestinal (1.19 casos por cada 1000 egresos hospitalarios).
- La reincidencia de AHA en esta región no es un fenómeno aislado.
- En portadores asintomáticos de *Entamoeba*, la infección por *E. histolytica* fue 3 veces más frecuente que con *E. dispar*.
- El método de extracción de DNA a partir de muestras fecales tiene un gran impacto en el resultado de la amplificación de las regiones polimórficas del DNA mediante PCR.
- El estudio del polimorfismo en la especie *E. histolytica* (genotipos) es de gran relevancia, particularmente en áreas endémicas de amibiasis para describir los patrones de transmisión en una área geográfica en particular, lo cual permitirá predecir el riesgo de enfermedad por este parásito en una región determinada.
- La utilización de marcadores polimórficos múltiples permite caracterizar mejor a *E. histolytica*, lo que ofrece una mayor confiabilidad en cuanto a la diversidad intra-específica de este protozoario.
- La utilización de marcadores para la genotipificación de aislados de *E. histolytica* podrían predecir la consecuencia de la infección en el huésped humano.

BIBLIOGRAFIA

1. Haque, R., et al., *Amebiasis*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1565-73.
2. Stanley, S.L., Jr., *Amoebiasis*. Lancet, 2003. **361**(9362): p. 1025-34.
3. Tannich, E., et al., *Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5118-22.
4. Espinosa-Cantellano, M. and A. Martinez-Palomo, *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 318-31.
5. Ramiro, M., et al., *Reincidence of amebic liver abscess: a case report*. Arch Med Res, 2000. **31**(4 Suppl): p. S1-3.
6. WHO/PAHO/UNESCO, *WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997*. Epidemiol Bull, 1997. **18**(1): p. 13-4.
7. Walsh, J.A., *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality*. Rev Infect Dis, 1986. **8**(2): p. 228-38.
8. Ravdin, J.I., *Immunobiology of human infection by Entamoeba histolytica*. Pathol Immunopathol Res, 1989. **8**(3-4): p. 179-205.
9. Ravdin, J.I., *Amebiasis now*. Am J Trop Med Hyg, 1989. **41**(3 Suppl): p. 40-8.
10. Petri, W.A., Jr. and U. Singh, *Diagnosis and management of amebiasis*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1117-25.
11. Tanyuksel, M. and W.A. Petri, Jr., *Laboratory diagnosis of amebiasis*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 713-29.
12. Caballero-Salcedo A, et al., *Seroepidemiology of amebiasis in Mexico*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **50**: p. 412-419.
13. Haque, R., et al., *Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children*. J Infect Dis, 2002. **186**(4): p. 547-52.
14. Ravdin, J.I. and B.L. Kelsall, *Role of mucosal secretory immunity in the development of an amebiasis vaccine*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **50**(5 Suppl): p. 36-41.
15. Ackers, J.P., *The diagnostic implications of the separation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*. Journal Bioscience, 2002. **27**(6): p. 573-578.
16. Diamond, L.S. and C.G. Clark, *A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt, 1925*. J Eukaryot Microbiol, 1993. **40**(3): p. 340-4.
17. Ghosh, P.K., et al., *Experimental amebiasis: molecular weight analysis of Entamoeba histolytica antigens recognized by IgG antibodies*. Indian J Exp Biol, 1999. **37**(8): p. 803-6.
18. Pérez-Tamayo, R. and Martínez-Palomo, *Amebiasis*, in *Pathology of amebiasis*, Elsevier, Editor. 1986: Amsterdam. p. 45-94.
19. Sepúlveda, B. and A. Martínez-Palomo, *Amebiasis*. En: *Tropical and geographical medicine*. Warren, K. S. and Mahmoud, A. A. S, ed. McGraw-Hill. 1984., New York. 305-318.
20. Treviño, G.M., et al., *Amebiasis indepidemiologic transition in México: it's morbidity an mortality trends in the Mexican institute of social security*. Arch Med Res, 1994. **25**.

21. de Leon, A., *Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano* Arch Invest Med (Mex), 1970. **1**.
22. Chester, B., et al., *Parasitologia clínica de Craig Faust*. 3 ed. 2003: Masson Doyma México.
23. Willhoeft, U. and E. Tannich, *The electrophoretic karyotype of Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **99**(1): p. 41-53.
24. Bhattacharya, A., et al., *The genome of Entamoeba histolytica*. Int J Parasitol, 2000. **30**(4): p. 401-10.
25. Willhoeft, U., L. Hamann, and E. Tannich, *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 Immun, 1999. **67**(11): p. 5925-9.
26. Clark, C.G., et al., *Unique organisation of tRNA genes in Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **146**(1): p. 24-9.
27. Clark, C.G., et al., *New insights into the phylogeny of Entamoeba species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes*. Int J Syst Evol Microbiol, 2006. **56**(Pt 9): p. 2235-9.
28. Loftus, B., et al., *The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica*. Nature, 2005. **433**(7028): p. 865-8.
29. Davis, P.H., J. Schulze, and S.L. Stanley, Jr., *Transcriptomic comparison of two Entamoeba histolytica strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin*. Mol Biochem Parasitol, 2007. **151**(1): p. 118-28.
30. Tovar, J., A. Fischer, and C.G. Clark, *The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol, 1999. **32**(5): p. 1013-21.
31. MacFarlane, R.C. and U. Singh, *Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent Entamoeba species: potential implications for amebic pathogenesis*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 340-51.
32. Ackers, J.P. and D. Mirelman, *Progress in research on Entamoeba histolytica pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 367-73.
33. de la Vega, H., et al., *Cloning and expression of chitinases of Entamoebae*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **85**(2): p. 139-47.
34. Stanley, S.L., Jr., et al., *Cloning and expression of a membrane antigen of Entamoeba histolytica possessing multiple tandem repeats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 4976-80.
35. Burch, D.J., et al., *Isolation of a strain-specific Entamoeba histolytica cDNA clone*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(4): p. 696-701.
36. Clark, C.G. and L.S. Diamond, *Entamoeba histolytica: a method for isolate identification*. Exp Parasitol, 1993. **77**(4): p. 450-5.
37. Ghosh, S., et al., *Molecular epidemiology of Entamoeba spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3815-21.
38. Ayeh-Kumi, P.F., et al., *Entamoeba histolytica: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene*. Exp Parasitol, 2001. **99**(2): p. 80-8.
39. Haghghi, A., et al., *Remarkable genetic polymorphism among Entamoeba histolytica isolates from a limited geographic area*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(11): p. 4081-90.

40. Haghghi, A., et al., *Geographic diversity among genotypes of Entamoeba histolytica field isolates*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3748-56.
41. Tawari, B., et al., *Patterns of Evolution in the Unique tRNA Gene Arrays of the Genus Entamoeba*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(1): p. 187-98.
42. Zaki, M. and C.G. Clark, *Isolation and characterization of polymorphic DNA from Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(3): p. 897-905.
43. Zaki, M., et al., *Genotyping of Entamoeba species in South Africa: diversity, stability, and transmission patterns within families*. J Infect Dis, 2003. **187**(12): p. 1860-9.
44. Ali, I.K., M. Zaki, and C.G. Clark, *Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5842-7.
45. Ali, I.K., et al., *Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 285-9.
46. Clark, C.G. and L.S. Diamond, *Differentiation of pathogenic Entamoeba histolytica from other intestinal protozoa by riboprinting*. Arch Med Res, 1992. **23**(2): p. 15-6.
47. Zaki, M., et al., *Simultaneous differentiation and typing of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1271-6.
48. Nesbitt, R.A., et al., *Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*. J Natl Med Assoc, 2004. **96**(5): p. 671-7.
49. Haque, R., et al., *Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(2): p. 449-52.
50. Haque, R., et al., *Rapid diagnosis of Entamoeba infection by using Entamoeba and Entamoeba histolytica stool antigen detection kits*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(10): p. 2558-61.
51. Acuna-Soto, R., et al., *Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg, 1993. **48**(1): p. 58-70.
52. Newton-Sanchez O, et al., *High rate of occult infection with Entamoeba histolytica among non-dysenteric mexican children*. Arch Med Res, 1997. **28** p. 311-313.
53. Lebbad, M. and S.G. Svard, *PCR differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(9): p. 680-5.
54. Calderaro, A., et al., *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. **100**(5): p. 450-7.
55. Verweij, J.J., et al., *Short communication: Prevalence of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in northern Ghana*. Trop Med Int Health, 2003. **8**(12): p. 1153-6.
56. Leiva, B., et al., *Overdiagnosis of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study*. Arch Med Res, 2006. **37**(4): p. 529-34.
57. Kebede, A., et al., *Overdiagnosis of amoebiasis in the absence of Entamoeba histolytica among patients presenting with diarrhoea in Wonji and Akaki, Ethiopia*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003. **97**(3): p. 305-7.
58. Tachibana, H., et al., *Distinguishing pathogenic isolates of Entamoeba*

- histolytica* by polymerase chain reaction. J Infect Dis, 1991. **164**(4): p. 825-6.
59. Blessmann, J., et al., *Real-time PCR for detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fecal samples*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): p. 4413-7.
 60. Tachibana, H., et al., *Asymptomatic cyst passers of Entamoeba histolytica but not Entamoeba dispar in institutions for the mentally retarded in Japan*. Parasitol Int, 2000. **49**(1): p. 31-5.
 61. Rivera, W.L., S.R. Santos, and H. Kanbara, *Prevalence and genetic diversity of Entamoeba histolytica in an institution for the mentally retarded in the Philippines*. Parasitol Res, 2006. **98**(2): p. 106-10.
 62. Nozaki, T., et al., *Diversity of clinical isolates of Entamoeba histolytica in Japan*. Arch Med Res, 2006. **37**(2): p. 277-9.
 63. Valenzuela, O., et al., *Epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora*. Ann Trop Med Parasitol, 2007. **101**(6): p. 533-8.
 64. Ali, I.K., et al., *Tissue Invasion by Entamoeba histolytica: Evidence of Genetic Selection and/or DNA Reorganization Events in Organ Tropism*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(4): p. e219.
 65. Ramos, F., et al., *E. dispar strain: analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **141**(2): p. 175-7.

ANEXO I

SHORT COMMUNICATION

Epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora

The division of the taxon once known as *Entamoeba histolytica* into two species, the pathogenic *E. histolytica* and the non-pathogenic *E. dispar*, has led to a need to re-evaluate the epidemiology of amoebic infection and disease in humans. Although all human infection with *E. histolytica* is now sometimes called amoebiasis, that term is restricted here to invasive intestinal or hepatic infection with the parasite.

Amoebiasis, which is endemic in many tropical and subtropical areas, is thought to be associated with millions of cases of dysentery and amoebic liver abscess every year (Walsh, 1986). Even in so-called 'endemic countries', however, there is a considerable lack of knowledge about the epidemiology of *Entamoeba* infection and the invasive disease that it may cause. In his now-classical review, Elsdon-Dew (1968) reported that Mexico was a major centre of invasive amoebiasis in the Americas, with other global 'hot-spots' in Natal and South-east Asia. According to more recent epidemiological surveys based on modern clinical and diagnostic tools (Abd-Alla *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000; Blessmann *et al.*, 2002), these observations made by Elsdon-Dew almost four decades ago — which were based mainly on the numbers of cases of amoebic liver abscess (ALA) being reported — still appear valid.

Some of the earliest data on the prevalence of amoebiasis in Mexico come from the autopsy-based studies of Dr Bernardo Sepúlveda. In these investigations (Sepúlveda, 1970), 195 cases of ALA were detected during 6126 autopsies performed, between 1954 and 1967, at the *Hospital General de la Ciudad de México*, and another

200 such cases were observed during 3000 autopsies performed, between 1963 and 1969, at the *Hospital General del Centro Médico Nacional*. Although clearly biased and limited in scope, these data indicate that, 30–40 years ago, 3%–7% of Mexicans had ALA at the time of their deaths. In 1992, the Mexican Institute of Social Security (IMSS), which provides healthcare to over half of the Mexican population, recorded the treatment of 369,440 new cases of invasive intestinal amoebiasis (i.e. either amoebic colitis or dysentery) and 1922 cases of ALA (Treviño García-Manzo *et al.*, 1994). Fortunately, although asymptomatic intestinal infections appear less responsive, symptomatic amoebiasis generally responds extremely well to treatment with metronidazole, and the extended availability of this drug in Mexico has markedly decreased national levels of *Entamoeba*-attributable mortality over the last 50 years. Before 1970, for example, 9%–13% of Mexican cases of ALA were fatal (Lee-Ramos and González-Montesinos, 1970; Alvarez and de la Rosa, 1971) but the corresponding level of fatality (as recorded by the IMSS) had fallen to just 1.2% by 1994. This decrease has been attributed not only to effective chemotherapy but also to more general improvements in the health services of Mexico, which have led to signs of an epidemiological transition, away from parasitoses and towards chronic degenerative diseases (Frenk *et al.*, 1989, 1991). The more recent official data on the incidence of ALA in Mexico (Ximénez, 2000) show a fall from 8.5 cases/100,000 in 1995 to 3.66 cases/100,000 in 2000 (albeit with a 'blip', of 9.04 cases/100,000,

in 1997). They also show, however, a marked geographical variation in the incidence of ALA, with some states being particularly badly affected. The recorded incidences of ALA in the large north-western state of Sonora, for example, were 26.97 cases/100,000 in 1995, and 12.57 cases/100,000 in 2002 — several-fold higher than the concurrent national mean values (www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/index.htm). The aim of the present study was to explore recent trends in ALA-associated morbidity in the state of Sonora (particularly in the state capital of Hermosillo)

The discharge records of the four main hospitals in Hermosillo (*Hospital General de la Secretaría de Salud*, *Hospital Regional No. 2*, *Hospital Infantil del Estado de Sonora*, and the *Hospital General*) for the period January 2000–December 2005 were analysed. The illness of each of the 268,923 patients recorded was categorized according to the ‘CIE-10’ international code for diseases (Anon., 2003). Diagnosis of ALA at the hospitals was based on clinical signs and symptoms, results of ultrasonography and laboratory analyses, high serum titres of anti-amoebic antibodies (as indicated by indirect haemagglutination or ELISA; Patterson *et al.*, 1990; Valenzuela *et al.*, 2001), and response to systemic treatment with metronidazole within 96 h of the first dose. The yearly and total incidences of ALA (for the four study hospitals combined) were calculated, as the numbers of cases/1000 patients discharged. Overall, 319 cases of ALA appeared in the records investigated, giving an overall incidence of 1.19 cases/1000 discharges over the 5-year study period. There was no evidence of a significant temporal change, up or down, in the yearly incidences recorded (Fig. 1).

Records of hospital discharges can provide very useful information for disease surveillance, particularly for those conditions, such as ALA, that always or frequently result in hospitalization (Schoenman *et al.*, 2005). They may also facilitate estimates of the financial burden

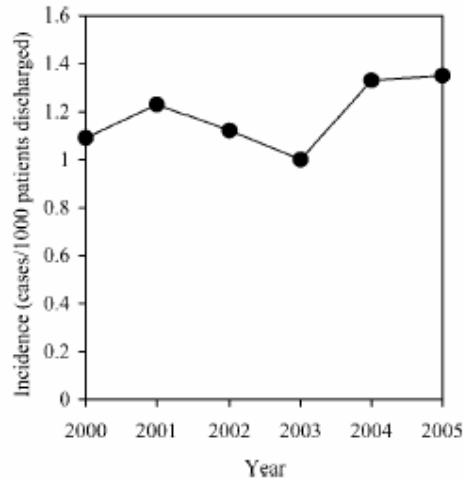


FIG. 1. The annual incidences of amoebic liver abscess (ALA) among the patients discharged from the four main hospitals in Hermosillo between 2000 and 2005. There was little year-on-year fluctuation ($r^2=0.32$; $P=0.24$).

posed by specific illnesses, such as ALA (Schoenman *et al.*, 2005).

The age- and gender-specific incidences of ALA recorded in the present study were as expected from the results of previous surveys, most of the recorded cases being aged 20–59 years (Table 1) and male (with four male cases for each female case).

The annual population incidences of ALA in Hermosillo, for the study period 2000–2005, are shown in Table 2. These values are based on the discharge records and the assumption that each case of ALA in the municipality was hospitalized in one of the four study hospitals. Curiously, not only do ‘official’ federal records of the annual incidence of ALA in Hermosillo county, which are available for the years 2000–2002, differ markedly from these estimates based on the discharge records but they also differ in different directions, being relatively low in 2000 (5.34 *v.* 7.14 cases/100,000) and 2001 (6.94 *v.* 8.40 cases/100,000) but relatively high in 2002 (12.57 *v.* 7.79 cases/100,000).

One surprising discovery made during the analysis of the discharge data was that four

TABLE 1. The age-specific incidences of amoebic liver abscess (ALA) among the patients discharged from the four main hospitals in Hermosillo between 2000 and 2005

Age (years)	No. of patients		Incidence*	
	With ALA	Discharged	Cases/1000 patients discharged	Odds ratio and (95% confidence interval)
<1	2	21,010	0.10	1.00
1-4	15	17,024	0.88	9.26 (2.04-58.54)
5-9	7	11,793	0.59	6.24 (1.20-43.36)
10-14	8	9727	0.82	8.64 (1.71-58.81)
15-19	12	14,380	0.83	8.77 (1.87-56.55)
20-29	67	54,659	1.23	12.88 (3.11-75.93)
30-39	75	41,504	1.81	18.98 (4.59-111.68)
40-49	65	26,367	2.47	25.90 (6.24-152.80)
50-59	39	20,119	1.94	20.36 (4.82-121.88)
60-69	18	18,217	0.99	10.38 (2.33-64.70)
≥70	11	34,123	0.32	3.39 (0.71-22.10)

*Age appeared to have a significant effect on incidence (χ^2 for trend=57.242; $P<0.001$).

of the ALA cases recorded (all females under 17 years of age) had each apparently recovered from a previous, treated episode of ALA. The only available data on the frequency of recurrence of ALA appear to be in the article by De León (1970), who indicated a value of about 0.04%/year. Although this frequency of recurrence has been mentioned in several more recent articles (Kretschmer, 1990; Ramiro *et al.*, 2000; Shizuma *et al.*, 2000), the present data indicate that, at least in highly endemic areas such as Sonora, it may be a gross under-estimate.

Although Hermosillo is the state capital and provides tertiary healthcare for the

entire state, most (75%) of the ALA cases detected in the present study lived either in Hermosillo or one of the four neighbouring municipalities (Fig. 2). Given the morbidity of ALA and the lack of alternative tertiary care in Sonora, it is unlikely that this is simply a reflection of convenience (with only cases that live near the hospitals presenting at the hospitals) and more likely that it is the result of relatively high incidence in and near the state capital. Blessmann *et al.* (2002) described another 'hot-spot' for ALA, Hue City in central Vietnam, where the estimated annual incidence was 106 cases/100,000. In Hermosillo (and Hue City), it would be interesting to investigate the prevalence of the DR3 human-leucocyte-antigen (HLA) haplotype, which, at least in Mexico, appears to be associated with increased risk of ALA (Arellano *et al.*, 1991, 1996). There are certainly reports, from other endemic areas, indicating significant associations between the distributions of ALA cases, invasive forms of intestinal amoebiasis and/or asymptomatic *Entamoeba* infections. These may be linked to domestic sources of water in a community (Omar *et al.*, 1995), intra-familial infection (Mochiri, 1965; Spencer *et al.*, 1981), patterns of behaviour that increase

TABLE 2. The annual incidences of amoebic liver abscess (ALA) in Hermosillo between 2000 and 2005 (assuming every case presented at one of the four main hospitals in the municipality)

Year	Incidence	
	No. of ALA cases	Cases/100,000 residents
2000	45	7.14
2001	54	8.40
2002	51	7.79
2003	48	7.19
2004	58	8.54
2005	63	9.12



FIG. 2. A map showing the location of Sonora state, in north-western Mexico, and the municipalities of Hermosillo, Santa Ana, Ures, Bacanora and Empalme within Sonora state. Most (75%) of the cases of amoebic liver abscess recorded in the present study lived within the circle indicated on the map.

the risk of infection — as seen in homosexual men or institutions for the mentally ill (Takeuchi *et al.*, 1989; Tachibana *et al.*, 1991) — or the distribution of particularly pathogenic strains of *E. histolytica* (Ramos *et al.*, 2005). The further application of molecular techniques to the detailed characterization of *Entamoeba* isolates and, more importantly, the study of genome polymorphism in both *E. histolytica* and *E. dispar* — in association with studies of the genetic characteristics (e.g. HLA haplotype) of the human host — should help elucidate the host-parasite relationships in both asymptomatic and symptomatic *Entamoeba* infection.

It seems curious that the incidence of ALA in Sonora — a relatively rich state with, for Mexico, a better-than-average sanitary infrastructure — is not markedly lower than that recorded in much poorer states of Mexico (although Sonora does differ from the poorer states in terms of climate and several other environmental characteristics). The per-capita income in the south-eastern state of Chiapas, for example, is only a small fraction of that in

Sonora (U.S.\$1200 *v.* U.S.\$10,000, in 2005) and Chiapas has a sanitary infrastructure well below that of Sonora. Official data collected by the *Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática* (www.inegi.gob.mx) indicate, however, that the incidences of ALA recorded in Sonora in 2000, 2001 and 2002 (6.94, 5.35 and 12.57 cases/100,000, respectively) were generally similar to those in Chiapas (7.63, 8.23 and 11.16 cases/100,000, respectively). Factors unrelated to social and economic development probably therefore also play a role in the incidence of invasive amoebiasis in endemic areas.

In summary, the present results indicate not only the burden posed by amoebic liver abscess in the Mexican state of Sonora, but also the urgent need for additional research, to identify the main risk factors that determine the epidemiological behaviour of the *E. histolytica* infections in this and other areas of Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS. This study was partially supported by the University of

Sonora and the National University of Mexico (via grant IN206405-3). The senior author is a biomedical-sciences doctoral fellow in the National University of Mexico's Faculty of Medicine. The authors thank M. Gudiño, for his help with the figures, and E. Ortiz, for her secretarial assistance.

O. VALENZUELA

Departamento de Ciencias Químico
Biológicas, Universidad de Sonora,
Boulevard Luis Encinas Jhonson y Blvd
Rosales s/n, CP 83000, Hermosillo,
Sonora, Mexico

P. MORÁN

Departamento de Medicina
Experimental, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de
Mexico, Dr Balmis 148, Colonia
Doctores, CP 06726, México, DF,
Mexico

A. GÓMEZ

Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Infecciosas y
Parasitarias, Hospital de Pediatría
Centro Médico Siglo XXI (IMSS),
Avenida Cuauhtemoc 330, Colonia
Doctores, CP 06720, México, DF,
Mexico

K. CORDOVA

N. CORRALES

J. CARDOZA

Departamento de Medicina Interna,
Hospital General del Estado 'Dr
Roberto Ramos Bours', Boulevard Luis
Encinas Jhonson y Reyes s/n, Colonia
Centro, CP 83000, Hermosillo,
Sonora, Mexico

N. GÓMEZ

Servicio de Urgencias, Hospital Infantil
del Estado de Sonora, Reforma #355,

Entre Avenidas 8 y 11, Colonia Ley 57,
CP 83100, Hermosillo, Sonora,
Mexico

M. CANO

Servicio de Infectología, Hospital Infantil
del Estado de Sonora, Reforma #355
Norte, Entre Avenidas 8 y 11, Colonia
Ley 57, CP 83100, Hermosillo,
Sonora, Mexico

C. XIMÉNEZ

Departamento de Medicina
Experimental, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de
Mexico, Dr Balmis 148, Colonia
Doctores, CP 06726, México, DF,
Mexico

Received 9 October 2006,

Revised 19 January 2007,

Accepted 22 January 2007

Reprint requests to: C. Ximénez.

E-mail: cximenez@servidor.unam.mx; fax: +52 55
5623 2669.

REFERENCES

- Abd-Alla, M. D., Wahib, A. A. & Ravdin, J. I. (2000). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**, 579–582.
- Alvarez, A. R. & de la Rosa, S. A. (1971). *Archivos de Investigación Médica*, **2**, 327–332.
- Anon. (2003) *Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud*, Vol. 1, 10th Edn. Washington, DC: Pan-American Health Organization.
- Arellano, J., Granados, J., Pérez, E., Félix, C. & Kretschmer, R. R. (1991). *Parasite Immunology*, **13**, 23–29.
- Arellano, J., Pérez-Rodríguez, M., López-Osuna, M., Velázquez, J. R., Granados, J., Justiniani, N., Santos, J. I., Madrazo, A., Muñoz, L. & Kretschmer, R. R. (1996). *Parasite Immunology*, **18**, 491–498.
- Blessmann, J., Pham Van, L., Fon Mi, P. A., Hao, D. T., Buss, H. & Tannich, E. (2002). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **66**, 578–583.
- De León, A. (1970). *Archivos de Investigación Médica*, **1**, 205–209.

- Eldon-Dew, R. (1968). *Advances in Parasitology*, **6**, 61–62.
- Frenk, J., Bobadilla, J. L., Sepúlveda, J. & López, C. M. (1989). *Health Policy and Planning*, **4**, 29–39.
- Frenk, J., Bobadilla, J. L., Stern, C., Frejka, T. & Lozano, R. (1991). *Health Transition Review*, **1**, 21–38.
- Jackson, T., Reddy, S., Fincham, J., Abd-Alla, M., Welles, S. & Ravdin, J. I. (2000). *Archives of Medical Research*, **31** (Suppl. 1), s36–s37.
- Kretschmer, R. R. (1990). In *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*, ed. Kretschmer, R. R. pp. 59–60. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lee-Ramos, A. F. & González-Montesinos, F. (1970). *Archives of Medical Research*, **1** (Suppl.), s199–s201.
- Mochiñ, E. (1965). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**, 231–235.
- Omar, M. S., Mähfous, A. A. & Abdel Monym, M. (1995). *Journal of Community Health*, **20**, 433–440.
- Patterson, M., Healy, G. R. & Shabot, J. M. (1990). *Gastroenterology*, **78**, 136–141.
- Ramiro, M., Morán, P., Olvera, O., Curiel, O., González, E., Ramos, F., Melendro, E. I. & Ximénez, C. (2000). *Archives of Medical Research*, **31** (Suppl. 4), 1–3.
- Ramos, F., Morán, P., González, E., García, G., Ramiro, M., Gómez, A., García de León, M. C., Melendro, E. I. & Ximénez, C. (2005). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 87–91.
- Schoenman, J. A., Sutton, J. P., Kintala, S., Love, D. & Maw, R. (2005). *The Value of Hospital Discharge Databases* (www.hcup-us.ahrq.gov/reports/final_report.pdf). Chicago, IL: NORC at the University of Chicago.
- Sepúlveda, B. (1970). *Gaceta Médica de México*, **100**, 201–254.
- Shizuma, T., Obara, H., Karasawa, E., Hayashi, N. & Yamawa, H. (2000). *Kansenshogaku Zasshi*, **79**, 585–587.
- Spencer, H. C., Sullivan, J. J., Mathews, H. M., Sauerbrey, M., Bloch, M., Chün, W. & Healy, G. R. (1981). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 63–68.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Takeoshi, M. & Ihara, S. (1991). *Journal of Infectious Diseases*, **164**, 825–826.
- Takeuchi, T., Okusawa, E., Nosaki, T., Kobayashi, S., Nizokami, M., Minoshima, N., Yamamoto, M. & Isomura, S. (1989). *Journal of Infectious Diseases*, **159**, 808.
- Treviño García-Marzo, N., Escandon-Romero, C., Escobedo de la Peña, J., Hernandez-Ramos, J. M. & Fierro-Hernandez, H. (1994). *Archives of Medical Research*, **25**, 393–399.
- Valenzuela, O., Ramos, F., Morán, P., González, E., Valadez, A., Gómez, A., Melendro, E. I., Ramiro, M., Muñoz, O. & Ximénez, C. (2001). *Parasitology Research*, **87**, 849–852.
- Walsh, J. A. (1986). *Reviews of Infectious Diseases*, **8**, 228–238.
- Ximénez, C. (Ed.) (2000). *Cuadernos FunSalud (34)*. Mexico City: Fundación Mexicana para la Salud.

ANEXO II



E. dispar strain: Analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution

Fernando Ramos^a, Gabriela García^a, Alicia Valadez^a, Patricia Morán^a, Enrique González^a, Alejandro Gómez^b, Emma I. Melendro^a, Olivia Valenzuela^a, Cecilia Ximénez^{a,*}

^a Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, México DF 06726, México

^b Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF 06726, México

Received 9 December 2004; received in revised form 2 February 2005; accepted 2 February 2005

Available online 23 March 2005

Abstract

The intra-species polymorphism of *E. histolytica* and *E. dispar* species in endemic area is an important tool for geographic distribution and spread mechanism studies. Since *E. dispar* and *E. histolytica* shares ecological niche, cell cycle, and transmission mechanism for human host, we studied the intra-species variation and distribution of *E. dispar* strains obtained from cyst passers, in two neighbor rural communities in Morelos Mexico. We analyzed the polymorphic region of the chitinase protein gene in isolates of *E. dispar*. In 45 isolates from one community we identified 12 different CHI patterns while in 15 isolates from the other community we identified 5 different patterns. However both communities share 4 patterns. This finding suggests the presence of strains with different geographic mobility.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *E. dispar*; *E. histolytica*; Intra-species polymorphism; Chitinase gene; Geographic mobility

1. Short report

The study of intra-species polymorphism of *E. histolytica* and *E. dispar* species in endemic areas, is an important tool for geographic distribution studies [1–4], detection of strains transmission patterns in a particular community, as well as for prediction of risk outcomes of invasive amoebic disease in a suitable population. Since *E. dispar* and *E. histolytica* shares ecological niche, cell cycle and transmission mechanism with the human host, we decided to study isolates from Robinson's medium of *E. dispar* specie [5], obtained from asymptomatic cyst passers in two neighbor rural communities in Morelos, Mexico, with the aim of detecting distribution of *E. dispar* strains in both communities.

Analyzed samples are part of a longitudinal study of prevalence and morbidity evaluation of *E. histolytica* and *E. dispar* species conducted in Casahuatlán and Cuahuixtla in the state of Morelos, 200 km away from South Mexico City.

DNA was extracted from cultures with phenol–chloroform [6]. The characterization of *E. dispar* specie was performed through PCR using specie-specific primers NPsp5'-3' to amplified sequences of rDNA from ribosomal small subunit [6], using an AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystem, Foster City, CA).

A highly polymorph region of chitinase enzyme gene was the target for the strain variation analysis by PCR. PCR was performed with genomic DNA and primers GAA SAA AAS GAA CAC CAG G (CHI 5') and GGG AYA CTA ACT TCT GGC TCA G (CHI 3') that flank a tandem repeated region of chitinase gene [7] with 35 cycles of 1 min for denaturation at 94 °C, annealing at 67 °C for 1.5 min and elongation at 72 °C for 2 min.

Fig. 1 shows the electrophoresis of PCR products in 1.2% agarose gel of repeated sequences for chitinase gene in *E. dispar* strains from the populations of Cuahuixtla and Casahuatlán.

Chitinase PCR products were purified (Qiagen Inc. Valencia, CA) and sequenced without cloning by PCR using the Big Dye Systems (Applied Biosystem, Foster City, CA.).

* Corresponding author. Tel.: +52 5556232666; fax: +52 5556262679.
E-mail address: cximenez@servidor.unam.mx (C. Ximénez).

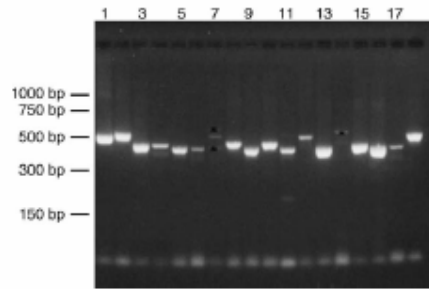


Fig. 1. Agarose gel separation of PCR products amplified with CHI 5/3 primers and DNA from several *E. dispar* isolates in Robinson's medium from Casahuatlán and Cuahuixtla communities. Lines 1 and 18: amplification product of *E. dispar* SAW760; lines 2–17: amplification products of *E. dispar* isolates. Line 5 shows the pattern GRX14a; lines 6, 9, 13 and 16 show the pattern GRX14b; lines 3, 4 and 15 show the patterns GRX15a; line 14 shows the patterns GRX15c; lines 8, 10, 11 and 17 show the pattern GRX16a; lines 7 and 12 show the pattern GRX18a and line 2 shows the pattern GRX19a. Bands with asterisk are irrelevant PCR fragments, verified by sequencing.

The polymorphic region of the chitinase gene has 21 nucleotide repetitions that codify for heptapeptides that differ slightly between each other. Sequences from each isolated strain were analyzed, translated and aligned [8]. Each strain was identified according to the number of repeated segments contained [3]. When the same number of repeated sequences was located in different order an additional alphabetical letter was included.

Our results show that even though the two studied communities are geographically close (<2 km), the distribution of *E. dispar* strains is different in each community. In Casahuatlán 12 different sequence patterns were obtained (10a, 13a, 14a, 14b, 14c, 15a, 15b, 15c, 16a, 18a, 18b and 19a). Four of them are also present in Cuahuixtla (14a, 14b, 15a and 18a). However, in this last community we observed one more and

unique pattern referred to as 8a as well as the aforementioned patterns (Table 1). The statistical analysis of differences in distribution of sequence patterns between both communities showed to be significant ($p=0.019$, Mann–Whitney U test). Even though these results are particularly interesting, these have to be taken with reserve due to the small number of analyzed samples.

The comparative analysis of the obtained sequence in both studied communities, with those *E. dispar* sequences previously reported [3], shows that the sequences of the strains HI 5/K 1, HI 2, SAW 760, SD 4 and SD 2 were also observed in our study (Table 1). Two of these patterns belong to *E. dispar* strains isolated in Mexico City at Hospital Infantil de Mexico SS (HI 5 and HI 2). Moreover, the sequence patterns of the HI 5 *E. dispar* strain isolated in Mexico is the same as the KI *E. dispar* strain isolated in Calcutta. This observation suggests a wide geographical distribution of these particular sequence type that is highly prevalent in both studied communities, 46.6% (7/15) in Cuahuixtla and 20.9% (9/44) in Casahuatlán.

The sequence of the strains SD4 and SD2 reported by Ghosh et al. [3] were also observed in our study in 22.72% (10/44) of the isolations, but the last one was only present in Casahuatlán. Both sequences (SD4 and SD2) correspond to strains detected in San Diego, CA, where migration of young adults from these rural communities is very frequent.

On the other hand the sequence pattern for chitinase gene in *E. dispar* SAW 760 included as a control strain [9] isolated from a English man and also reported by Ghosh et al. [3], was detected in 20% (3/15) of isolates obtained from Cuahuixtla and only in 2.3% (1/44) from Casahuatlán. It is important to mention that sequence pattern 8a was only observed in Cuahuixtla and it displayed a unique short sequence (Table 1). However, in Casahuatlán there were seven sequence patterns that had not been reported previously. They represent 22.7% of the studied strains in this community (Table 1).

Table 1
Chitinases sequence patterns of *E. dispar* isolates from the communities Cuahuixtla and Casahuatlán in Morelos, Mexico

Chi-code ^a	Sequence pattern	Number of isolates from		Strains reported by Ghosh et al. [3]
		Cuahuixtla	Casahuatlán	
GRX8a	1-2-3-4-4-7-4-3	1 ^b	–	
GRX10a	1-2-3-4-5-7-7-3-7-3	–	1 ^a	
GRX13a	1-2-3-4-5-7-6-7-7-7-3-7-3	–	2 ^b	
GRX14a	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-3-7-3	3	7	SD4
GRX14b	1-2-3-4-5-7-6-7-7-7-7-3-7-3	7	9	HI5, KI
GRX14c	1-2-3-4-4-7-6-7-7-7-7-3-7-3	–	1 ^b	
GRX15a	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3	1	7	HI2
GRX15b	1-2-4-4-4-5-4-6-7-7-7-7-3-7-3	–	3 ^b	
GRX15c	1-2-3-4-5-7-6-7-7-7-7-7-3-7-3	–	1 ^b	
GRX16a	1-2-3-2-4-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3	–	10	SD2
GRX18a	1-2-3-4-4-4-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3	3	1	SAW760
GRX18b	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-7-7-7-3-7-3	–	1 ^b	
GRX19a	1-2-3-2-4-4-4-4-4-4-4-5-4-6-7-3-7-3	–	1 ^b	

^a The GenBank access number of these sequences are from AY8220940 to AY8220952.

^b Primary identification in Morelos, México; patterns from this study.

The presence of highly similar sequence patterns in isolates from two different geographic areas can suggest the possible spread of related strains of these parasites, however, to be conclusive it is necessary to add more than one genetic marker. In our results we cannot exclude the possible existence of a convergence phenomenon between the strains studied in Calcutta and the ones reported in our work. Efforts in that direction are already ongoing.

On the other hand our results suggest the existence of *E. dispar* strains with high, intermediate or low geographic mobility. Taking into account that *E. dispar* and *E. histolytica* share transmission mechanisms for human host and ecological niches, the molecular and the epidemiological information obtained from *E. dispar* can be reasonable extrapolated to *E. histolytica*. The analysis of polymorphism of *E. dispar* and particularly of *E. histolytica* species is a promising strategy for the study of geographic distribution of epidemiological relevant groups or strains of these important protozoa.

Acknowledgments

We acknowledge technical assistance from Mrs. Angélica Limón and Mr. Marco Gudiño; and the secretarial assistance from Mrs. Ma. Elena Ortiz. We are also very grateful to Mrs. Guadalupe Castañón for kindly supplying the axenic culture of *E. dispar* strain. The present work was partially

supported by CONACyT 42176M and DGAPA IN234202-2 grants.

References

- [1] Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS. *Entamoeba histolytica* extrachromosomal circular ribosomal DNA: analysis of clonal variation in a hypervariable region. *Exp Parasitol* 1992;74:200–4.
- [2] Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol* 1993;77:450–5.
- [3] Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, et al. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (demographic sweep) and trans continental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol* 2000;38:3815–21.
- [4] Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol* 2002;40:4081–90.
- [5] Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968;62:285–94.
- [6] Clark CG. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by ribotyping. In: Persing DH, Smith TE, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*, vol. 4. Washington, DC: ASM Press; 1993. p. 468–74.
- [7] De la Vega H, Specht CA, Semino CE, et al. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;85:139–47.
- [8] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988;16:10881–90.
- [9] Clark CG. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba tissoti* Geiman and Wichteremann 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *J Euk Microbiol* 1995;42:590–3.

ANEXO III

Identificación de la *Entamoeba histolytica/E. dispar* por la técnica de amiba en fresco vs su tinción con hematoxilina-eosina en la diarrea aguda

(*Entamoeba histolytica/E. dispar* identification by hematoxylin-eosine stain technique in children with acute diarrhea)

Norberto Gómez-Rivera,* Antonio F Molina M,** Ma. Guadalupe García Z,* Juan D Castillo A,* Jaime Castillo R,* Roberto J García H,* Ignacio Fonseca Chon,* Oliva Valenzuela A*

RESUMEN

Objetivo. Comparar la efectividad de la detección de *Entamoeba histolytica/E. dispar* con la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (H/E) vs la técnica de amiba en fresco (AF), en niños con enfermedad diarreica aguda (EDA).

Material y métodos. Se analizaron muestras de evacuaciones de 137 niños con EDA. Se hizo la búsqueda en fresco de la *Entamoeba histolytica/E. dispar* y simultáneamente se buscó el parásito mediante la técnica de tinción con H/E. Se relacionó la sospecha clínica de amebiasis con el resultado obtenido por las técnicas de laboratorio.

Resultados. Con el método de tinción de H/E se encontraron trofozoitos de amiba en 35 de los 137 sujetos mientras con la técnica de AF solo en 5 casos ($p > 0.001$). Hubo la sospecha clínica de amebiasis en 52 y en 29 casos se pudo comprobar la presencia de eritrofagocitosis. Con la técnica de H/E la presunción de portadores del parásito *E. histolytica/E. dispar* fue más alta ($p < 0.001$), mientras que con la AF la sospecha fue positiva en 4 de los 52 casos.

Conclusiones: La técnica de tinción con H/E en frotis fue más efectiva en la observación de trofozoitos con eritrofagocitosis.

Palabras clave: Amebiasis, diagnóstico de amebiasis, tinción hematoxilina-eosina, eritrofagocitosis.

SUMMARY

Objective. To compare the effectiveness of stain technique using the dyes hematoxylin and eosine (H/E) for the identification of *Entamoeba histolytica/E. dispar*, with the well known, direct observation technique of fresh stool sample (FSS) taken in children with acute diarrhea (AD).

Material and methods. The samples of stool of 137 children with diarrhea were prepared in a smear with a drops of Lugol solution. The microscopy observation of the feces was done in fresh samples of stools, before 30 minutes. Simultaneously amoeba was looked in fresh stools by the stain technique with H/E. The positive cases were related according to the clinical presumption of amebiasis.

Results. With the stain technique H/E were found positives 35 smears obtained in 137 children. Using the other technique only 5 cases were positives ($p < 0.001$) in the same children. There was a clinical presumption of amebiasis in 52 children, in 29 of them it was observed the presence of eritrophagocytosis in the smear study.

Conclusions. The stain contrast technique of feces, using H/E, show high effectiveness in order to observed the *Entamoeba histolytica* eritrophagocytosis.

Key words: Amebiasis, amebiasis diagnosis, hematoxylin-eosine stain, eritrophagocytosis.

La amebiasis intestinal es una infección causada por la *Entamoeba histolytica/E. dispar*, exclusiva del humano. En la década pasada la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que es la segunda parasitosis más importante por su frecuencia en el mundo, solo después del paludis-

mo. La técnica para la identificación de la amiba en fresco (AF), como una forma rápida para reconocer la presencia de trofozoitos en pacientes con enfermedad diarreica aguda, se ha recomendado desde hace varias décadas para afirmar el diagnóstico clínico de amebiasis intestinal.^{1,2} Sin embargo, hay con frecuencia dificultad para discriminar entre esta *Entamoeba* y otras no patógenas (*Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *E. hartmanni*, *Iodamoeba butschlii*), si no se tiene la experiencia suficiente para re-

* Hospital Infantil del Estado de Sonora.

** Hospital de Ginecología y Pediatría del IMSS, Hermosillo, Son.

conocerlas al microscopio de luz y es morfológicamente indistinguible de la *Entamoeba dispar*.^{3,5}

El propósito de este estudio fue explorar la posibilidad de que la tinción con hematoxilina y eosina (H/E) en un frotis de materia fecal pudiera ser una alternativa más segura y eficaz que la técnica de "amiba en fresco", pues es posible observar con mayor claridad la eritrofagocitosis de la amiba, siendo esta una característica propia de la *Entamoeba histolytica*.^{6,7} En este informe se compara la efectividad en la detección de la *E. histolytica/E. dispar* por AF vs la técnica de H/E, relacionando ambas técnicas con respecto a la impresión clínica y la presencia de sangre en evacuaciones con la técnica de tinción con hematoxilina-eosina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron las muestras de evacuaciones obtenidas en 137 niños con enfermedad diarreica aguda (EDA); todos ingresaron, para observación, al Servicio de Urgencias del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) entre el 1 de enero de 2003 al 31 de enero de 2004. Las muestras se obtuvieron con la técnica "del pañal invertido" o mediante la estimulación rectal con un hisopo, depositando la muestra de heces en un frasco de boca ancha. Fueron incluidos para el estudio los niños cuya EDA tenía una evolución menor de 7 días, entre 1 mes y 18 años de edad y que requirieron ser observados en el servicio de urgencias. Se excluyeron a todos los enfermos con diarrea de larga evolución, los que fueron transferidos a otro centro hospitalario, los que tuvieron antígenos para rotavirus en heces (rotazime positivo), aquellos con diarrea osmótica y los que tuvieron una enfermedad agregada.

Tan pronto se obtenían en ellos las muestras de heces, se hacía la búsqueda de *E. histolytica/E. dispar* por la técnica de amiba en fresco, en los primeros 30 minutos. Esta se hizo en el laboratorio clínico del hospital, de la siguiente manera: se colocó la muestra de heces en la parte central de un portaobjetos, en el extremo izquierdo se colocó una solución salina y en la derecha lugol. Luego se homogeneizaron en la laminilla, primero la solución salina y luego el lugol y se colocó el cubreobjetos. La observación se consideró positiva cuando se identificó el o los trofozoitos con eritrofagocitosis, motilidad continua, presencia de pseudópodos, y movimiento unidireccional de la ameba.

La otra fracción de la muestra de heces se envió al servicio de patología para buscar la *E. histolytica/E. dispar* por la técnica de tinción con H/E. Esta consiste en: hacer un frotis de la evacuación en una laminilla fijándola en alcohol al 80% durante 5 minutos; luego se su-

merge en hematoxilina por 5 minutos y se lava la muestra en agua corriente para someterla a baño en alcohol ácido (0.5 mL de concentrado de ácido clorhídrico por cada 100 mL de alcohol), para luego lavar la laminilla y sumergirla en agua amoniacal (0.5 mL de concentrado de amoníaco por cada 100 mL de agua destilada), se lava y se sumerge en eosina por 5 minutos, se deshidrata y se aclara con xileno y se observa al microscopio. Se consideró positiva cuando se observaron trofozoitos con eritrofagocitosis, el núcleo de ellos en la periferia y con el cariosoma central.

En la técnica de amiba en fresco, la variable de desenlace fue la presencia de trofozoitos mientras que en el de la tinción la presencia de la amiba; como fracasos en ambas, fue la ausencia de estas. Los resultados obtenidos con ambas pruebas fueron relacionados con la sospecha clínica de amebiasis. Se consideró como sospecha clínica positiva, cuando los pacientes manifestaron tener dolor abdominal, tipo cólico, acompañado de pujo y tenesmo, y se observó disminución del tono del esfínter del ano y la presencia de evacuaciones con moco y sangre. Como sospecha clínica negativa se consideró la presencia de evacuaciones diarreicas sin las manifestaciones señaladas antes. Los datos fueron analizados por Ji cuadrada y la prueba de Fisher, mediante el programa EPI info 6.

RESULTADOS

Se encontraron trofozoitos de amiba en 35 de los 137 casos con el método de tinción de H/E y solo en 5 de las mismas 137 muestras de heces; las diferencias en la frecuencia con la que fue posible observar los trofozoitos fue significativamente mayor con la tinción H/E [$\chi^2 = 26.2$, $p < 0.0001$]. (Cuadro 1).

Al examinar la correlación de sospecha clínica de amebiasis y la prueba positiva, se encontró que la sospecha clínica en aquellos niños con sangre en las heces, la técnica con H/E mostró que en 29 de 52 pacientes fue positiva para la presencia de trofozoitos y eritrofagocitosis [$\chi^2 = 40.2$, $p < 0.0001$]. Mientras que la sospecha clínica pudo ser probada con la prueba de amiba en fresco, en solo 4 de las 52 muestras de heces, sin significación estadística [Fisher: $p = 0.068$] (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Se sabe que el diagnóstico presuntivo de amebiasis es clínico, solo se confirma mediante la observación de la endamoeba en las heces. La técnica ampliamente usada en los servicios hospitalarios de urgencia desde hace décadas, es la observación de la amiba en fresco.⁸ Esta se

Cuadro 1. Observación de *Entamoeba histolytica* en las muestras de heces según se haya usado la técnica de ameba en fresco o de hematoxilina y eosina.

Técnica	Trofozoitos negativos	Trofozoitos positivos	χ^2	p
H/E	102	35	26,2	< 0,001
AF	132	5		

Cuadro 2. Sospecha clínica de amebiasis, por presencia de sangre y los resultados obtenidos por la técnica de búsqueda de ameba en fresco y la tinción de heces con hematoxilina-eosina.

Sangre en heces	Hematoxilina-eosina		Ameba en fresco		Fisher p
	Positivo	χ^2	Positivo	Negativo	
Con	29	40,2*	23	4	48 > 0,068
Sin	6		79	1	84
Total	35		102	5	132

*P < 0,0001

recomienda por la rapidez con que se obtiene el resultado; pero algunas limitaciones: puede confundir amebas patógenas con las no patógenas cuando no se observa eritrofagocitosis; por otro lado, no es posible distinguir entre amebas morfológicamente idénticas que no son patógenas, como es el caso de *E. dispar*.^{9,10}

Por eso, visualizar en un microscopio convencional los trofozoitos en su estado natural por la técnica de ameba en fresco, esta ha sido ampliamente recomendada. En este estudio fue posible el diagnóstico de amebiasis en mayor número de casos mediante la técnica de tinción con hematoxilina-eosina: la diferencia entre los casos diagnosticados con esta técnica (35 casos) fue altamente significativa ($p < 0,0001$) con respecto a los casos diagnosticados por la técnica de ameba en fresco (5 casos). Mediante este método, de manera práctica y técnicamente simple, es posible reconocer la patogenicidad de la endamoeba, al visualizar el núcleo y el citoplasma de este protozooario y los eritrocitos que ha fagocitado; los colorantes orgánicos selectivos, como en la técnica de H/E empleada en este estudio, permiten reconocer que la ameba es patógena. Usando esta técnica la hematoxilina tinte de color rosado el citoplasma del trofozoito, resaltando así los eritrocitos que ha fagocitado; por su parte, la eosina resalta de el núcleo del parásito al colorarlo de azul (Figura 1). Aun cuando esta técnica sea efectiva, es conveniente mencionar que, independientemente de la técnica que se use, la identificación de la



Figura 1. Tinción con la técnica de hematoxilina-eosina. Las flechas señalan eritrocitos fagocitados, algunos hemolizados por la digestión intracelular.

ameba, sus estructuras y los eritrocitos fagocitados precisan que el personal haya sido capacitado para reconocer a la *E. histolytica* y diferenciarla de macrofagos o leucocitos con eritrocitos fagocitados.^{10,11} Lo que se tuvo muy presente entre quienes hicieron las observaciones en este estudio.

En cuanto al diagnóstico clínico de amebiasis: a partir de la sintomatología y particularmente por la presencia de sangre, permitió sospechar, con una mayor probabilidad, que 52 niños tenían ameba; de estos, 29 de los 52 casos con sangre en las heces fueron positivos con la tinción de H/E [$\chi^2 = 40,2$, $p < 0,0001$], en tanto que solo 4 de los 52 lo fueron con la técnica de ameba en fresco [$p = 0,068$]. Cabe mencionar que, en los casos con sangre en las heces tuvieron como característica común la presencia de moco abundante y tener una evolución menor de 24 horas con diarrea.

Aun cuando es del dominio general que existen dos especies de amebas morfológicamente semejantes: una la *E. histolytica* y la otra, la *E. dispar*, sólo pueden diferenciarse una de la otra por pruebas inmunológicas y estudios genéticos; que en la práctica son de difícil acceso a la mayoría de los hospitales de segundo nivel.¹²⁻¹⁵ Por esta razón la técnica de tinción con H/E es una alternativa recomendable, por su proceso rápido y de bajo costo, que puede ser de gran ayuda para confirmar el diagnóstico y dar el tratamiento precozmente.

La detección de trofozoitos con la técnica de la AF, como en otros estudios,¹⁶⁻¹⁸ mostró con mayor frecuencia resultados negativos y rara vez pudo observarse la presencia de los trofozoitos y material purulento; de los 52 casos con sospecha clínica, únicamente en 4 casos se reportaron resultados positivos y en un caso sin sangre en las heces se identificaron trofozoitos. Es pertinente hacer

mención que 6 niños sin sangre en las heces fueron positivos por la presencia de amiba en las heces. Así, el empleo de la H/E para identificar trofozoitos posiblemente evitara la tendencia a sobrediagnosticar la amebiasis con criterio clínico, sin tener ninguna base que apoye o que oriente el diagnóstico al de una infección sintomática invasora. Lo ideal sería contar con un apoyo de laboratorio, aparte de la AF, que permita, ante la sospecha clínica, relacionar la patogenicidad de la amiba mediante la observación de un frotis, pues existen otros agentes biológicos a los que se asocia la presencia de moco y sangre en las evacuaciones, en ocasiones acompañados de pujo y tenesmo y en otras con prolapso rectal.

Será deseable que en futuras investigaciones se valore la sensibilidad y la especificidad del método de H/E tomando como estándar de oro la identificación de la amiba por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la técnica de ELISA. Cabe, pues, concluir que la técnica de tinción con H/E en un frotis de heces frescas permitió observar la eritrofagocitosis de trofozoitos de amiba, comprobando el diagnóstico clínico de amebiasis en mayor número de niños; la confirmación del diagnóstico fue significativamente menor con la técnica de amiba en fresco. Por otra parte la técnica de H/E permitió identificar un mayor número de niños con amiba y la presencia de sangre en las heces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los técnicos patólogos: Sofía López V. y Silvia Carvajal M. por su valiosa colaboración, y a los doctores: Guillermo López Cervantes, Manuel A. Cano Rangel y Roberto García Hernández, por sus comentarios y sugerencias en este trabajo.

Referencias

1. *Harrison principios de medicina Interna*. 14ª edición. España; McGraw- Hill Interamericana, 1998; 1342, 1347-1351.
2. Omar MS, Awad ME, al-Madani AA. Giardiasis and amoebiasis infections in three Saudi closed communities. *J Trop Med Hyg* 1991; 94: 57-60.
3. Furst C, Gomes MA, Taluri WL, Silva EF. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Furst C- Pathologica* 2002; 94(1): 22-7.
4. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 228-237.
5. Nesbitt RA. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Natl Med Assoc*. 2004; 96(5): 671-7.
6. Procop GW. Gastrointestinal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1073-108.
7. Reyes L, León R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amebiasis intestinal. *Rev Costarric Cienc Med* 2002; 23: 161-173.
8. Healy GH, Ravdin JT. Diagnostic techniques for stool samples. In: *Amebiasis: human infection by E. histolytica*. New York: J Wiley & Sons, 1988: 635-649.
9. Jong E. Intestinal parasites. *Prim Care* 2002; 29(4): 857-877.
10. Gonin P. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 237-41.
11. Stanley SL Jr. Review Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology* 2001; 17: 280-285.
12. Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami P et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 58-70.
13. Cox FEG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 595-612.
14. Petri Jr WA, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1117-25.
15. Haque R, Mollah NU, Ali IKM et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 32-35.
16. Bernal-Sánchez G, Rebollo-Vargas FJ. Estado actual de la amebiasis. *Cir Ciruj* 1997; 65(5): 151-156.
17. Abd Alla MD, Ravdin JL. Diagnosis of amebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 366-370.
18. Bruckner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992: 356-369.

Correspondencia:
Dr. Norberto Gómez Rivera
Servicio de Urgencias
Hospital Infantil de Sonora
Reforma Final No. 355 Norte
CP 83000 Hermosillo, Sonora.

