



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTITLÁN CAMPO UNO**

**“DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE *Entamoeba histolytica* y  
*Entamoeba dispar* MEDIANTE PCR EN HECES DE NIÑOS DE DOS  
ALBERGUES DE LA SIERRA TARAHUMARA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**FLAVIO GERMÁN SÁNCHEZ MONROY**

**ASESOR: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FAACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIO

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Diagnóstico diferencial de Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar mediante PCR en heces de niños de dos albergues de la Sierra Tarahumara"

que presenta el pasante: Sánchez Monroy Flavio Germán  
con número de cuenta: 09507810-8 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de diciembre de 2010.

|                  |                                     |  |
|------------------|-------------------------------------|--|
| PRESIDENTE       | MC. Juan Pablo Martínez Labat       |  |
| VOCAL            | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo      |  |
| SECRETARIO       | Dra. María Magdalena Aguirre García |  |
| PRIMER SUPLENTE  | MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes     |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | QFB. Raquel Tapia Romero            |  |

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, bajo la dirección de la Dra. Maria Magdalena Aguirre García.

Apoyo por el proyecto DGAPA/PAPIIT IN221606, con número de registro DGOCE: 2008-12-28-1063

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Por permitirme vivir día a día y no abandonarme, por que sin su voluntad divina nada es posible.

### **A mis Padres**

Por existir, sin ustedes no estaría aquí. Por el esfuerzo mostrado siempre en impulsarnos y exigir dar lo mejor de uno mismo en la familia, la escuela y la vida. Por ser como son en carácter, fortaleza e ir siempre hacia delante.

### **A mis Hijas**

Ustedes son mis tres canciones favoritas, tres fuerzas poderosas para motivarme a seguir estudiando, en esforzarse en luchar hasta el último. Son ustedes lo quienes llenan mi vida de alegría y optimismo. Son luz que ilumina mi camino Rebecca, Clarita y Nadezhda

### **A mis Hermanos**

Por estar conmigo y apoyarme siempre, desde la niñez hasta hoy. Por todas las travesuras y momentos graciosos que he pasado con ustedes. Gracias Iván, Paulina, Guadalupe, Rosario, Juanita y Leslie.

### **Al amor de mi vida**

Por mostrarme que la vida tiene momentos inesperados y que siempre da una nueva oportunidad de ser feliz. Por regresar a mi después de no verte tanto tiempo pero que siempre estuviste ahí. A ti Corazón mío gracias por existir, te Amo Edith Emma.

### **A mi Asesora**

Gracias Dra. María Magdalena por brindarme la oportunidad de estar en su equipo y darme la confianza y la paciencia para terminar este proyecto, por permitirme aprender de usted y estar en ese lugar tan hermoso.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 por brindarme la oportunidad de estudiar en sus aulas y cultivar el alma y espíritu.

A los proyectos PAPIIT IN221606 y PAPIIT IN212409 por el apoyo económico para la realización de esta tesis y por la beca otorgada por PAPIIT IN22/606.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García por permitirme realizar este proyecto tan importante con su equipo de trabajo, por la confianza y paciencia.

A la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser por permitirme trabajar en sus instalaciones y terminar este trabajo de tesis.

A la M. en C. Alma Escalona Montaña, por enseñarme los conocimientos y técnicas necesaria para realizar este trabajo, sin ti no habría sido posible esto, mil gracias.

A la Dra. Miriam Berzunza Cruz por su apoyo en los ensayos de PCR.

A mis sinodales: MC. Juan Pablo Martínez Labat, a la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, a la MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes y a la QFB. Raquel Tapia Romero y Dra. Maria Magdalena Aguirre García gracias por el tiempo brindado para la revisión y corrección de esta tesis.

Al técnico Marco E. Gudiño Zayas por su apoyo en la digitalización de las imágenes.

A todos los chicos del laboratorio por brindarme su amistad y compañía en los momentos más difíciles y más agradables gracias Yenni, Araceli, Aratzeni, Bere, Carlos, Jaime, Juan, Daniel, gracias a todos.

**ÍNDICE**

|  | Páginas |
|--|---------|
| Lista de figuras   | III     |
| Lista de tablas  | IV      |
| Lista de gráficos  | V       |
| RESÚMEN  | VI      |
|  | 1       |
| 1.- INTRODUCCIÓN   |         |
| 1.1.- Generalidades  | 1       |
| 1.1.1.- Historia   | 1       |
| 1.1.2.- Epidemiología  | 2       |
| 1.1.3.- Clasificación taxonómica   | 3       |
| 1.2.- Ciclo de vida y biología de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> | 3       |
| 1.3.- PATOGÉNESIS  | 7       |
| 1.4.- Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> .                    | 9       |
| 1.4.1.- Cisteín proteasas  | 9       |
| 1.4.2.- Gal/GalNac   | 9       |
| 1.4.3.- Ameboporo  | 9       |
| 1.4.4.- <i>E. histolytica</i> y oxígeno                                    | 10      |
| 1.4.5.- Bacterias asociadas y virulencia                                   | 10      |
| 1.5.- BIOLOGIA MOLECULAR   | 11      |
| 1.6.- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA <i>E. histolytica</i>                    | 12      |
| 1.6.1.- Microscopía  | 13      |
| 1.6.2.- Cultivo y Análisis por isoenzima                                   | 13      |
| 1.6.3.- Ensayo de ELISA  | 15      |

|   |    |
|---|----|
| 1.6.3.1.- Detección de anticuerpos  | 15 |
| 1.6.3.2.- Detección de antígenos  | 16 |
| 1.6.4.- Ensayo Inmunocromatográfico   | 17 |
| 1.6.5.- Diagnóstico basado en DNA   | 17 |
| 1.6.5.1.- PCR   | 17 |
| 1.6.5.2.- PCR en tiempo real  | 18 |
| 1.7.- Tratamiento   | 20 |
| <br>  |    |
| 2.- JUSTIFICACIÓN   | 21 |
| <br>  |    |
| 3.- OBJETIVOS   | 21 |
| <br>  |    |
| 4.- METODOLOGÍA   | 22 |
| 4.1.- Diagrama de flujo   | 25 |
| 4.1.1.- Materiales y Métodos  | 26 |
| 4.2.- Ensayo de PCR   | 27 |
| 4.2.1.- Mezcla de reacción  | 28 |
| 4.2.2.- Amplificación   | 29 |
| 4.2.3.- Electroforesis en gel de agarosa para detección del DNA amplificado | 29 |
| <br>  |    |
| 5.- RESULTADOS  | 31 |
| 5.1.- Resultados LOTE 1   | 31 |
| 5.2.- Resultados LOTE 2   | 38 |
| <br>  |    |
| 6.- DISCUSIÓN   | 43 |
| <br>  |    |
| 7.- CONCLUSIÓN  | 48 |
| <br>  |    |
| 8.- REFERENCIAS   | 50 |
| APÉNDICE  | 58 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1. <i>E. histolytica</i> en heces.  | 4  |
| Fig. 2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .   | 6  |
| Fig. 3. Modelo del mecanismo de inducción de inflamación y daño tisular en la colitis amibiana.            | 8  |
| Fig. 4. Municipio de Guachochi y Municipio de Batopilas  | 24 |
| Fig. 5. Resultados de los amplificadores de las muestras 1, 2, 3, 4 y 5                                    | 32 |
| Fig. 6. Resultados de los amplificadores de las muestras 6, 19, 40, 88                                     | 33 |
| Fig. 7. Resultados de los amplificadores de las muestras 253, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 301, 268 y 302 | 34 |
| Fig. 8. Resultados de los amplificadores de las muestras 262, 280, 289, 300, 310, 311, 316, 319 y 321      | 35 |
| Fig. 9. Resultados de las muestras: 5, 9, 301  | 39 |
| Fig. 10. Incidencia de Amibiasis intestinal en la República Mexicana.                                      | 46 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Ejemplos de cebadores usados en PCR convencional para <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .   | 4  |
| Tabla 2. Algunos medicamentos empleados en el tratamiento de colitis amibiana y ALA.  | 6  |
| Tabla 3. Resultados totales por Albergue para el LOTE 1.  | 8  |
| Tabla 4. Resultados globales por PCR de ambos albergues para el Lote 1.   | 24 |
| Tabla 5. Resultados de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> para el albergue Kírare del LOTE 1.   | 32 |
| Tabla 6. Resultados de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> para el albergue Sehuérachi del LOTE 1.   | 33 |
| Tabla 7. Resultados totales para el LOTE 2.   | 34 |
| Tabla 8. Resultados del LOTE 2 para <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> para el albergue Kírare  | 35 |
| Tabla 9. Resultados del LOTE 2 para <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> para el albergue Sehuérachi.   | 39 |
| Tabla 10. Comparación en base a la prevalencia infantil inicial y la prevalencia infantil final para <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> de los niños de los albergues Kírare y Sehuérachi entre los meses de diciembre y enero. | 46 |

## LISTA DE GRAFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1. Gráfica de los resultados globales para <i>E. histolytica/E. dispar</i> en porcentajes del Lote 1.                    | 4  |
| Gráfico 2. Resultados de <i>E. histolytica/E. dispar</i> para el albergue Kírare del LOTE 1 Representados en porcentajes.        | 6  |
| Gráfico 3. Resultados de <i>E. histolytica/E. dispar</i> para el albergue Sehuérachi del LOTE 1 representados en porcentajes.    | 8  |
| Gráfico 4. Resultados de <i>E. histolytica/E. dispar</i> globales para el LOTE 2.  | 24 |
| Gráfico 5. Porcentaje de los Resultados para <i>E. histolytica/E. dispar</i> para el albergue Kírare correspondientes al LOTE 2. | 32 |
| Gráfico 6. Resultados para <i>E. histolytica/E. dispar</i> del albergue Sehuérachi correspondientes LOTE 2.                      | 33 |

## RESUMEN

La amibiasis es una de las enfermedades parasitarias más importantes a nivel mundial ya que ocupa el 5° lugar entre las primeras causas de enfermedad. Su agente causal es *Entamoeba histolytica*. Esta parasitosis tiene dos manifestaciones clínicas: la disentería amibiana y la amibiasis sistémica. La amibiasis sistémica tiene como principal manifestación el absceso hepático amibiano (AHA). Existen diferentes metodologías para diagnosticar *E. histolytica* y diferenciarla de *Entamoeba dispar* (parásito comensal no invasivo). Estas metodologías incluyen: el ensayo inmunocromatográfico, el análisis por isoenzima, análisis serológico por ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y las metodologías basadas en biología molecular como la PCR. La microscopía es aun la metodología más empleada para diagnosticar *E. histolytica*/*E. dispar*, pero con esta técnica no se puede diferenciar a una especie de otra.

En la Sierra Tarahumara existen comunidades muy apartadas de los centros de salud y en consecuencia no existe de la posibilidad de diagnóstico y tratamiento a diversas enfermedades que padecen. La Sierra Tarahumara tiene grandes extensiones territoriales que abarcan parte de los estados de Chihuahua y Coahuila, debido a esto la inaccesibilidad que poseen determina sus carencias.

En esta investigación se realizó un diagnóstico basado en biología molecular, la PCR. Las muestras fueron enviadas desde dos comunidades de la Sierra Tarahumara ubicadas en Chihuahua. Estas comunidades son: Kírare, ubicada en el municipio de Batopilas; y Sehuérachi, ubicada en el municipio de Guachochi. Ambas comunidades Kírare y Sehuérachi se encuentran a grandes distancias de sus cabeceras municipales y solo se puede acceder a ellas a pie. Debido a las condiciones geográficas los servicios de luz y drenaje son limitados, por lo cual los niños de las zonas aledañas a cada comunidad llegan a los albergues citados en la temporada invernal para recibir alimentación y atención médica entre los meses de diciembre y enero de cada año.

Se recibieron un total de 181 muestras de los dos albergues en el Lote 1, las cuales fueron todas positivas para *E. histolytica* por microscopía de luz. El albergue Kírare envió 81 muestras y el albergue Sehuérachi 100 muestras.

Para realizar el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* por PCR, se realizó un amplificado de una región altamente repetitiva que codifica para la subunidad pequeña de RNA ribosomal presente en el DNA de *E. histolytica* y *E. dispar*. Los productos de PCR fueron: un fragmento de 166 pb (pares de bases) específico para *E. histolytica* y un fragmento de 752 pb específico para *E. dispar*.

El ensayo de PCR dio los siguientes resultados en el Lote 1: se obtuvo un porcentaje de 9.94 % (18 muestras) de resultados positivos para *E. histolytica*, de los cuales el albergue Kírare obtuvo 6.08 % (11 muestras) de resultados positivos a *E. histolytica* y el albergue Sehuérachi obtuvo un 3.86 % (7 muestras) de resultados positivos a *E. histolytica*. No se obtuvieron resultados positivos para *E. dispar*.

Se dio tratamiento antiparasitario a los 18 pacientes que resultaron positivos a *E. histolytica* y se realizó una segunda toma (Lote 2).

En el Lote 2 el albergue Kírare obtuvo 11.1 % (2 muestras) de resultados positivos para *E. histolytica* y el albergue Sehuérachi 5.6 % (1 muestra) de resultados positivos para *E. histolytica*. En este lote tampoco se obtuvieron resultados positivos para *E. dispar*.

El total de muestras procesadas del Lote 1 y del Lote 2 fue de 199 muestras.

Debido a que la sensibilidad y especificidad son mayores en la metodología por PCR, se espera que en el futuro se establezca como la técnica de diagnóstico más empleada no solo para determinar la presencia de *E. histolytica*, sino de muchos otros parásitos protozoarios y evitar el subdiagnóstico o el diagnóstico erróneo.

## 1.- INTRODUCCIÓN.

Entre las parasitosis más comunes alrededor del mundo se encuentra la amibiasis, de la cual se registran más de 50 millones de casos anualmente<sup>1</sup>. En México las infecciones por helmintos y protozoarios están entre las 20 primeras causas de enfermedad. La amibiasis, con sus diferentes manifestaciones clínicas, ocupa el 5° lugar<sup>1</sup>. Esta parasitosis tiene como agente causal a *Entamoeba histolytica* de la cual se conocen actualmente algunos de los factores de patogenicidad como la lectina Gal/GalNac, las cisteinproteasas y el ameboporo. El protozoario *E. histolytica* produce una parasitosis intestinal en la mayoría de los casos, pero puede evolucionar hacia una parasitosis sistémica formando el **Absceso Hepático Amibiano** (AHA), además puede migrar a otros órganos y raramente puede invadir pulmón y cerebro<sup>2</sup>.

En México existen poblaciones altamente endémicas para *E. histolytica* como las regiones de Morelos y el Estado de México<sup>7</sup>, pero en la Sierra Tarahumara no existen reportes precisos sobre amibiasis a pesar de existir reportes para el estado de Chihuahua. En este trabajo de investigación se realizó un diagnóstico, mediante el ensayo de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), de las especies *Entamoeba dispar* y *Entamoeba histolytica* en dos albergues localizados al sur del estado de Chihuahua, en los municipios de Batopilas y Guachochi.

### 1.1 Generalidades.

#### 1.1.1 Historia.

Feder Lösch en San Petersburgo (1875) encontró amibas en muestras fecales, fueron reconocidas como responsables de mantener el proceso inflamatorio, pero no como causa de la disentería. Fritz Schaudin en 1903 estableció la diferencia entre *E. histolytica* y *Entamoeba coli*, basándose en que algunos pacientes desarrollaban lesiones y otros permanecían asintomáticos. Schaudin propuso que *E. histolytica* tenía la capacidad de provocar lisis tisular<sup>3</sup>.

Emile Brumpt (1925) basado en estudios experimentales, señaló a *E. histolytica* como un complejo de especies que comprendía dos formas indistinguibles, *Entamoeba dysenteriae* la cual es la causante de la infección sintomática, y *Entamoeba dispar* la cual se encuentra en portadores asintomáticos. Luis Diamond *et al.* (1961) durante la década de los 60's desarrollo un medio de cultivo axénico para *E. histolytica* el cual permitió realizar estudios *in vivo* e *in vitro*<sup>3</sup>. Sargeunt y Williams en 1978 distinguieron por primera vez cepas de *E. histolytica* mediante análisis por isoenzimas, confirmando de esta forma dos especies: la patógena y a la no patógena<sup>4</sup>. En 1993 Diamond y Clark describieron nuevamente la hipótesis que Brumpt planteara en 1925, con lo que concluyeron que había evidencia para proponer la existencia de dos especies morfológicamente indistinguibles, una patógena y otra no patógena, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* respectivamente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) aceptó esta hipótesis en 1997<sup>5</sup>.

### **1.1.2. Epidemiología.**

La amibiasis es más común en países subdesarrollados (por ejemplo: México, Bangladesh, Birmania), en inmigrantes y viajeros que han visitado dichos países<sup>6</sup>. Tiene mayor prevalencia en niños, se presenta más en hombres que en mujeres, así como también en hombres homosexuales que han practicado sexo oral/anal y en pacientes inmunosuprimidos. *E. histolytica* afecta aproximadamente al 10 % de la población mundial y su prevalencia es mayor en México, América Central, América del Sur, Asia y África. En México constituye uno de los principales motivos de consulta con aproximadamente 1 millón de casos al año. En clases sociales altas esta parasitosis se encuentra en bajo porcentaje, aunque el grupo más afectado es el pediátrico. Por otra parte, más del 90 % de los individuos infectados permanecen asintomáticos, siendo transmisores de la infección, ya que se registran de 40 a 50 millones de casos anualmente con una mortalidad de 40, 000 a 100, 000 individuos a nivel mundial<sup>7</sup>.

Existen dos tipos de amibiasis: la intestinal y la extraintestinal. La amibiasis intestinal puede ser sintomática (colitis y/o disentería) o asintomática (luminal). La amibiasis extraintestinal tiene como principal manifestación el AHA. Muchos casos letales por *E. histolytica* son causados por la formación de AHA, el cual es tres veces más frecuente en adultos varones que en mujeres y casi ausente en niños y adultos mayores, en contraste con la infección intestinal, la cual es raramente letal y menos frecuente en adultos<sup>8</sup>. La amibiasis intestinal se complica con colitis fulminante o necrosante en el 0.5 % de los casos, con una mortalidad del 40 %. La forma hepática con ruptura intraperitoneal es poco frecuente, ya que solamente se presenta del 2 al 7 %, pero tiene una mortalidad muy elevada. Los niños constituyen el grupo de mayor riesgo para presentar las formas fulminantes, lo que resulta en una elevada tasa de mortalidad infantil<sup>7</sup>.

### **1.1.3 Clasificación Taxonómica.**

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: *Sarcomastigophora*

Subphylum: *Sarcodina*

Clase: *Lobosea*

Orden: *Amoebida*

Familia: *Entamoebidae*

Género: *Entamoeba*

Especie: *Entamoeba histolytica*<sup>62</sup>

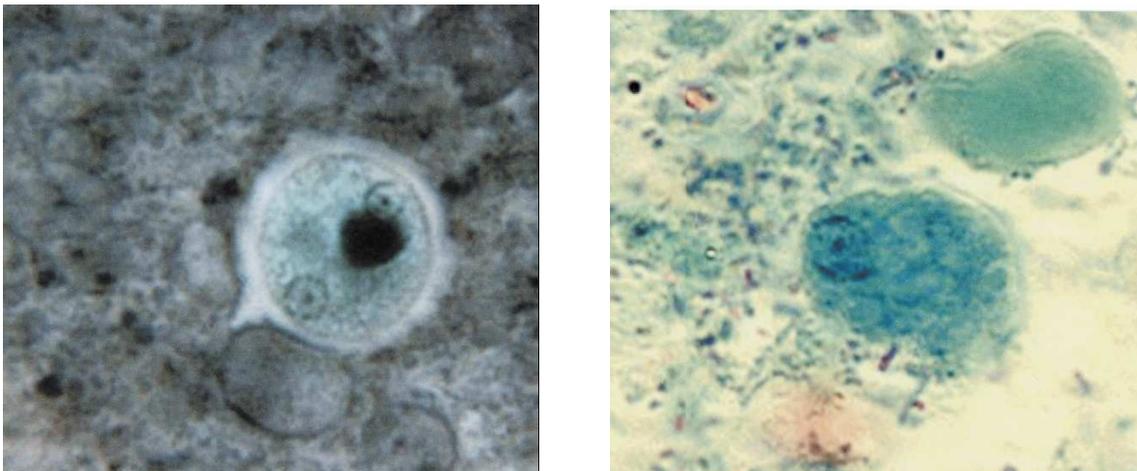
### **1.2 Ciclo de vida y biología de *E. histolytica* y *E. dispar*.**

Debido a que estas dos especies comparten las mismas características morfofisiológicas, no así la patogenicidad, se describirá el ciclo de vida de *E. histolytica*. Los humanos son el principal hospedero conocido de *E. histolytica* y la principal fuente de transmisión. Las heces con quistes del parásito pueden contaminar comida fresca o agua. Otra fuente común de transmisión es el contacto

sexual oral-anal. Los quistes pueden ser propagados por artrópodos tales como cucarachas y moscas, lo que sugiere que estos insectos son capaces de jugar un raro rol en la transmisión<sup>9</sup>.

A diferencia del quiste inerte, el trofozoíto de *E. histolytica* es sumamente móvil, pleomórfico, su diámetro varía de 10 a 50  $\mu\text{m}$ . La fuente de energía para este constante movimiento es la conversión anaerobia de la glucosa y el piruvato a etanol<sup>10</sup>.

Los quistes de *E. histolytica* son redondos, generalmente miden de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y están envueltos por una pared refringente la cual tiene quitina. Estos contienen cuatro núcleos, glicógeno y restos ribosomales llamados cuerpos cromatoides (figura 1). El quiste puede mantenerse vivo fuera del hospedero por semanas o meses, especialmente en condiciones de humedad<sup>30</sup>, pero es rápidamente destruido a temperaturas menores de  $-5^{\circ}\text{C}$  y mayores de  $40^{\circ}\text{C}$ <sup>9</sup>.



**FIGURA 1.** *E. histolytica* en heces. Tomado de Stanley, L. Samuel Jr., Amoebiasis (Seminar).

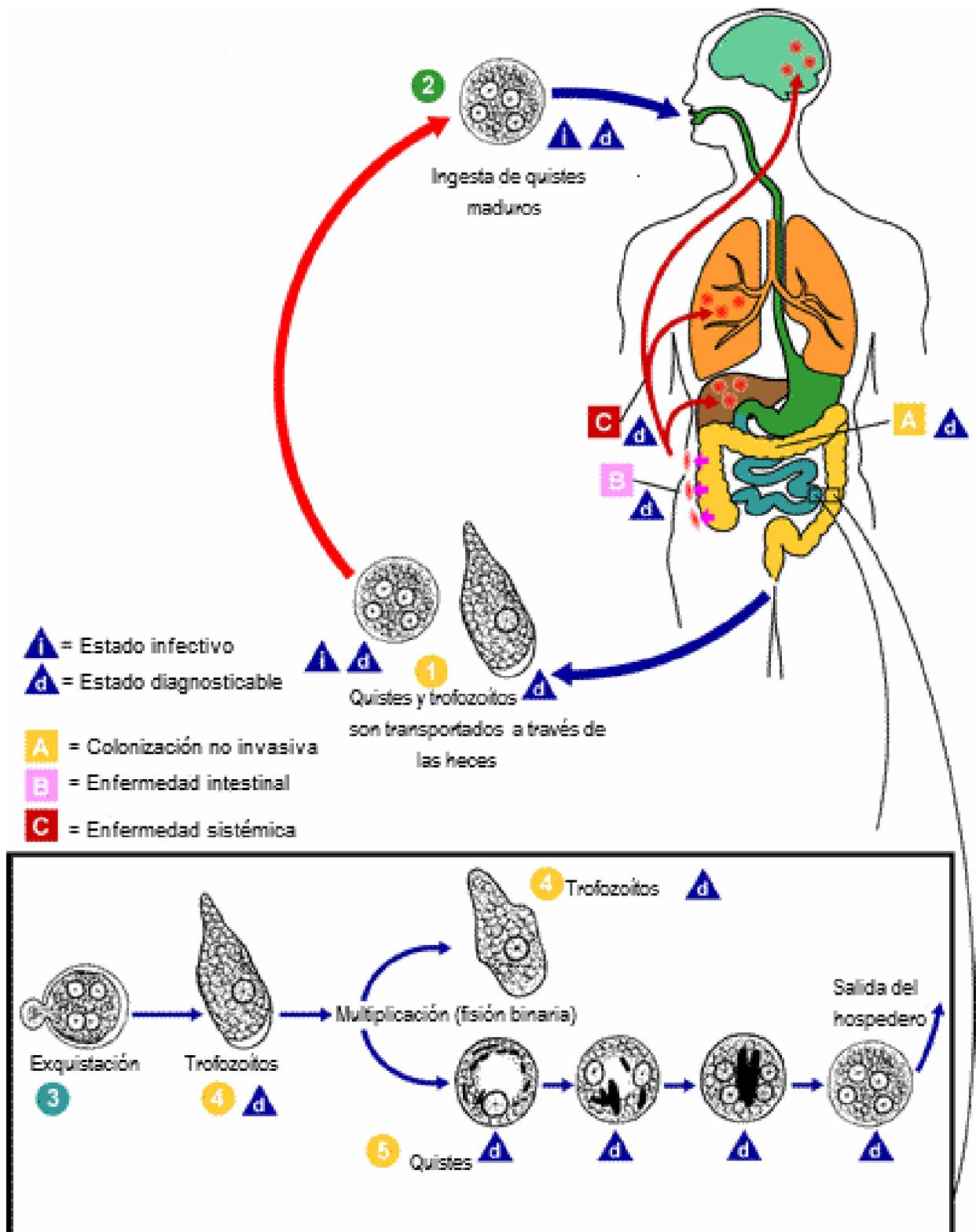
El ciclo de vida de *E. histolytica* es simple. Consiste en una fase infectiva, que es el quiste y en una fase activa, el trofozoíto. El humano se infecta por ingestión de los quistes infectivos, los cuales viajan a través del lumen del estómago al intestino delgado (ileon terminal), donde cada quiste forma ocho trofozoítos. Los trofozoítos son formas móviles que pueden adherirse y atravesar

las células de epitelio intestinal y así ingresar al torrente sanguíneo, o pasar a lo largo del intestino.

Estos quistes sobreviven al ácido del estómago, viajan a través del intestino delgado, y dentro del ileon terminal o colon, se exquistan pasando a la fase de trofozoíto<sup>12</sup>.

El citoplasma frecuentemente contiene muchos eritrocitos que han sido ingeridos. Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen siempre un núcleo sencillo y son fácilmente destruidos en algunos minutos en el medio externo.

Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden convertirse en un prequiste con un núcleo, y madurar hacia un quiste maduro con cuatro núcleos y migrar hacia afuera del colon. El prequiste contiene agregados de ribosomas, llamados cuerpos cromatoides, así como vacuolas de comida que son expulsados cuando se da el encogimiento antes de llegar a un quiste maduro, esta es la fase infecciosa<sup>11</sup>.



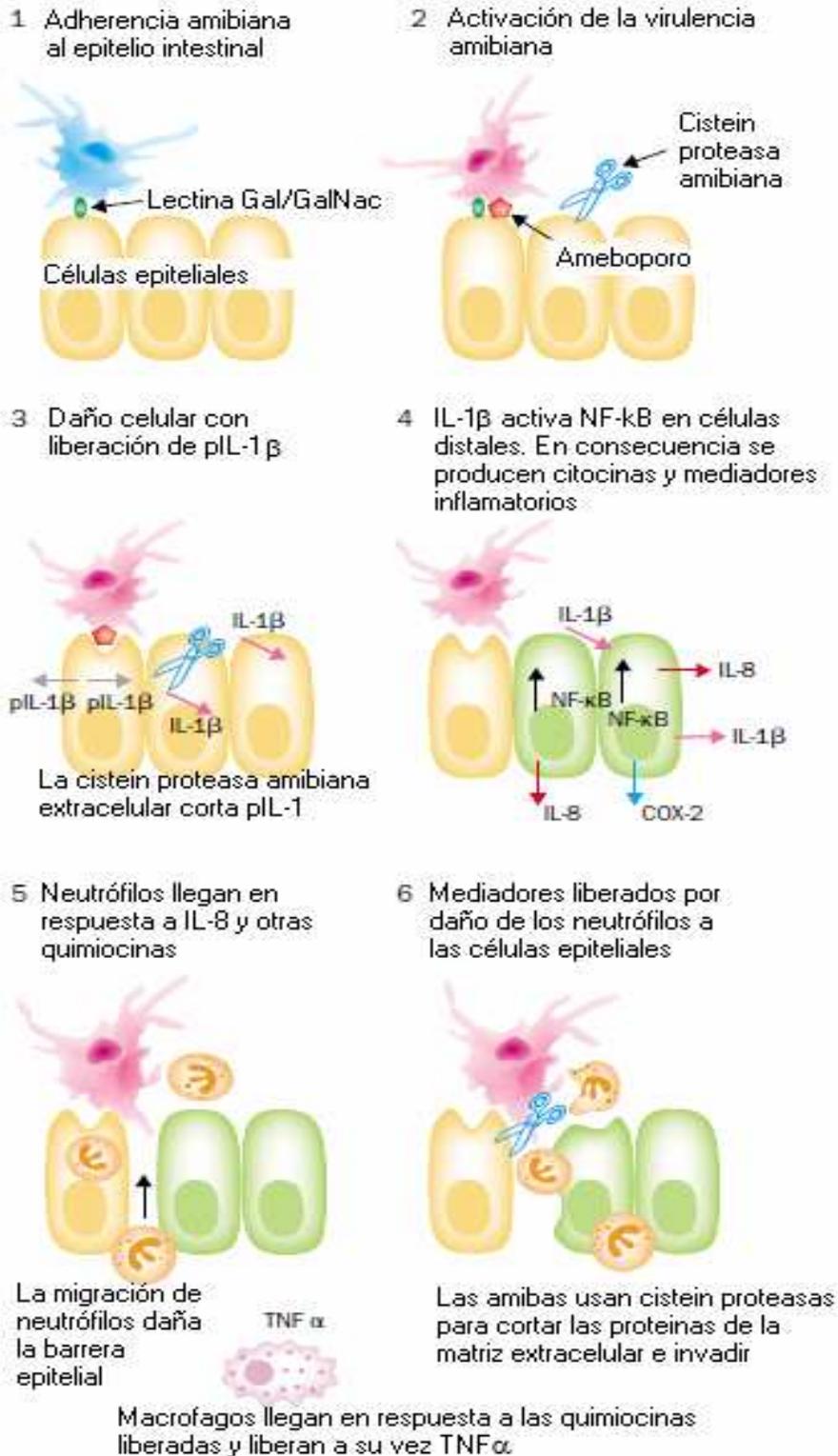
**FIGURA 2.** Ciclo de vida de *E. histolytica*. Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

### 1.3 Patogénesis.

Los quistes, fase infectiva, no son invasivos pero los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal. El modelo más aceptado de colitis amibiana consiste en los siguientes pasos:

1. Unión de los trofozoítos al epitelio intestinal por medio de la lectina Gal/GalNac.
2. Durante esta unión, los trofozoítos secretan cisteínproteinasas y liberación del ameboporo al sitio de unión con el epitelio intestinal.
3. Esto resulta en un daño a epitelio y muerte, con liberación de mediadores incluyendo precursores de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el cual debe ser transformado a la forma activa por las cisteinproteasas extracelulares de *E. histolytica*.
4. Las interleucinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  liberadas por las células, se unen a las células adyacentes del epitelio intestinal y activan al factor de translocación nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). La activación de NF- $\kappa$ B en el epitelio intestinal resulta en síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-8 y otros mediadores incluyendo COX-2 y la iNOS. Estos mediadores y los liberados por las células atraen células inflamatorias del hospedero, especialmente neutrófilos a las regiones de la mucosa y submucosa.
5. Los neutrófilos, en contacto con la amiba, son lisados y liberan mediadores que dañan o matan a las células epiteliales. La migración de los neutrófilos entre las células epiteliales y la superficie de la mucosa pueden posteriormente dañar la permeabilidad de la barrera intestinal.
6. Entonces *E. histolytica* puede invadir a las capas de la submucosa usando cisteínproteasas para unirse a las proteínas de la matriz extracelular y migrar entre las células dañadas<sup>18</sup>.

Diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en heces de niños de dos albergues de la Sierra Tarahumara.  
 Flavio Germán Sánchez Monroy



**FIGURA 3.** Modelo del mecanismo de inducción de inflamación y daño tisular en la colitis amibiana. Tomado de Stanley, L. Samuel Jr, Amoebiasis (Seminar)<sup>9</sup>.

#### **1.4 Factores de virulencia de *E. histolytica*.**

Algunos de los factores implicados en la patogénesis de la amibiasis, ya presentados en la FIGURA 3, no están del todo claros, pero exponemos aquí los considerados hasta ahora más importantes.

**1.4.1 Cisteín proteasas.** Estas proteinasas degradan la matriz extracelular facilitando la invasión por los trofozoítos<sup>19</sup>. Se ha encontrado un decremento en el tamaño del absceso hepático en animales, cuando trofozoítos virulentos han sido mezclados con inhibidores de cisteinproteasas antes de ser inyectados en hígado<sup>17</sup>. Seis diferentes genes codifican para cisteínproteasas en el caso de *E. histolytica* y análogos de seis genes han sido encontrados en *E. dispar*<sup>18</sup>.

**1.4.2 Gal/GalNac.** Esta lectina, una proteína heterodimérica (cadena pesada de 170 kDa y una ligera con un peso molecular de 31 a 35 kDa que está involucrada en la adherencia del trofozoíto de *E. histolytica* a las células del epitelio intestinal. Esta proteína se une a los residuos terminales galactosa/N-acetil-D-galactosamina presentes en las glicoproteínas de las células epiteliales. También esta involucrada en el proceso de evasión de lisis vía complemento de las células hospedero. La lectina Gal/GalNac esta localizada en la membrana citoplasmática de *E. histolytica* y puede interactuar con el citoesqueleto. El citoesqueleto de actina es una red altamente dinámica compuesta por polímeros de actina y una gran variedad de proteínas asociadas y juega un papel muy importante. Una de las principales funciones del citoesqueleto de actina es mediar la forma y movilidad celular en respuesta a los estímulos externos, debido a esto los trofozoítos amibianos realizan varias funciones especializadas: motilidad, adhesión, pinocitosis y fagocitosis, quimiotaxis, formación de casquete y citocinesis<sup>20,21</sup>.

**1.4.3 Ameboporo.** En los 80's se descubrió que la amiba produce una proteína capaz de formar canales de iones o poros en las membranas lipídicas y entonces despolarizar las células atacadas. El factor formador del poro fue llamado ameboporo. La familia de ameboporos comprende 3 miembros, los cuales fueron

aislados de la cepa patógena HM-1:IMSS. Las tres isoformas, ameboporo A, B y C se encuentran en una proporción aproximada de 35:10:1<sup>22,23</sup>. Aunque las tres isoformas exhiben actividad de formación de poro hacia las vesículas lipídicas, se diferencian en la cinética que tienen para formar el canal de iones. El ameboporo A es citolítico para células humanas nucleadas, pero no lisa eritrocitos<sup>24</sup>. Todas las isoformas lisan células de manera dosis-dependiente, pero el ameboporo C muestra mayor efecto citolítico más que los ameboporos A y B hacia las células eucariotas<sup>14,24</sup>.

**1.4.4 *E. histolytica* y oxígeno.** *E. histolytica* es un anaerobio facultativo y como tal carece de muchas de las enzimas necesarias para la fosforilación oxidativa. El intestino constituye un medio bajo en oxígeno, pero durante la invasión al tejido el trofozoíto es expuesto a un incremento de oxígeno en el medio. La amiba contiene enzimas de fermentación que reducen el oxígeno a peróxido de hidrógeno con poca o nula pérdida de energía. Estas enzimas de fermentación incluyen la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (POF)<sup>25</sup> y ferredoxina<sup>26</sup>, las cuales son muy similares a sus equivalentes en las bacterias anaerobias. Esas dos proteínas son de interés considerable ya que son blancos de medicamentos para el tratamiento de la amibiasis, ya que el metronidazol es reducido y activado por la oxidación de la ferredoxina<sup>20</sup>.

**1.4.5 Bacterias asociadas y virulencia.** La frecuencia de infecciones por *E. histolytica* parecen ser más altas en niños infectados con *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*<sup>27</sup>. Otras investigaciones han sugerido que *E. histolytica* en asociación con cepas de la bacteria *Escherichia coli* serotipo 055, *Salmonella greenside* 050 y *S. dysenteriae* tipo I es más citotóxica que cualquiera de esos organismos solos<sup>28</sup>. Ellos encontraron que los trofozoítos pueden unirse a cada una de estas bacterias mediante *N*-acetil galactosamina o un alfa-metil manosa. Verdón y col.<sup>29</sup> han determinado que los trofozoítos se unen e internalizan *S. flexneri* expresando el tipo I de pili de *E. coli*, ésto conlleva a un aumento en la

patogenicidad de *E. histolytica* y en general esta evidencia supone que estas bacterias crean un medio intestinal que incrementa la virulencia del parásito<sup>20</sup>.

### **1.5 Biología Molecular.**

En el año 2005 el genoma de *E. histolytica* HM-1:IMSS fue completado teniendo como consecuencia un amplio uso de la información en los laboratorios de investigación. El genoma consiste en 23,751,783 pares de bases distribuidos en al menos 14 cromosomas<sup>56</sup>. Posee 9938 genes teniendo una densidad por gen de 2.4 Kb. *E. histolytica* tiene 92 genes bacterianos, probablemente por haber fagocitado bacterias intestinales durante su evolución en el tracto digestivo. La mayoría de estos genes están involucrados en vías metabólicas y presumiblemente le sirven a la ameba para usar caminos metabólicos bacterianos que le permiten adaptarse a las bajas concentraciones de oxígeno del intestino, así puede prescindir de los organelos que tienen el resto de los eucariontes. Los cromosomas no están condensados en el medio y se presentan en forma haploide cuya longitud varía mucho entre cromosomas homólogos de diferentes aislados. Esto hace difícil la determinación del número exacto de cromosomas<sup>30,56</sup>.

Uno de los hallazgos más sorprendentes es la abundancia de genes de RNAt<sup>31</sup>. Más del 10 % de la secuencia contiene genes para RNAt los cuales están organizados en tándem. Las regiones intergenómicas son ricas en adenina y timina (cerca del 80%) y contiene regiones no codificantes repetidas en tandem (SRTs). Estas regiones son empleadas como DNA blanco a amplificarse (PCR) dada la repetitividad a lo largo del genoma y presentan las siguientes ventajas: a) Muestra una alta especificidad para distinguir variaciones entre diferentes cepas de *E. histolytica*. b) Se genera un amplificado por cada SRTs. c) No es necesario el uso de endonucleasas de restricción. d) es especie específico. e) No es necesario el cultivo ya que la PCR se puede emplear muestras de DNA a partir de heces. f) Solo se necesita una pequeña cantidad de DNA ya que es altamente repetitivo. g) El uso de múltiples loci permite reducir la probabilidad de confundir cepas<sup>32</sup>.

## **1.6 Métodos de diagnóstico para *E. histolytica*.**

La *E. histolytica* es idéntica en morfología a *E. dispar* (sarcodino no patógeno) por lo cual es necesario tener acceso a métodos de diagnóstico que permitan diferenciar a estas dos especies para determinar la aplicación de un tratamiento, el cual es necesario solo para casos de amibiasis producida por *E. histolytica*.

Los métodos para diferenciar a *E. histolytica* de las especies no patógenas como *E. dispar*, tienen en la actualidad un amplio abanico de opciones, de las cuales, la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ofrece la mayor sensibilidad (grado para detectar la presencia de un agente patógeno en una muestra) y especificidad (grado para diferenciar un agente patógeno entre otros agentes presentes en la muestra) que cualquier otro ensayo.

Los métodos para diagnosticar a *E. histolytica* y *E. dispar*, se clasifican de la siguiente manera:

- 1.6.1 Microscopía.
- 1.6.2 Cultivo y Análisis mediante Isoenzima
- 1.6.3 Ensayo de ELISA
  - 1.6.3.1 Detección de Anticuerpos
  - 1.6.3.2 Detección de Antígenos
- 1.6.4 Ensayo inmunocromatográfico
- 1.6.5 Diagnóstico basado en DNA
  - 1.6.5.1 PCR
  - 1.6.5.2 PCR en tiempo real

### **1.6.1 Microscopía.**

El diagnóstico de *E. histolytica* ha sido históricamente realizado por examen microscópico de la morfología del protozooario<sup>9</sup>. Las técnicas microscópicas empleadas en diagnóstico clínico incluyen la preparación en fresco, concentración y preparaciones teñidas<sup>21</sup>. El análisis microscópico de muestras en fresco es un método muy poco sensible (<10 %)<sup>18</sup> a esto se suma el hecho de que es imposible distinguir entre las tres especies morfológicamente idénticas: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*. Las preparaciones teñidas requieren el uso de colorantes tales como: tinción tricrómica, hematoxilina férrica, tinción de Ziehl-Nielsen, Giemsa, yodo, azul de metileno, yoduro de D'Antoni y lugol<sup>21, 33</sup>, las cuales facilitan la identificación del quiste y del trofozoíto. La sensibilidad de este método en preparaciones teñidas es muy baja (<60 %) y pueden resultar falsos positivos debido a la incorrecta identificación de macrófagos como trofozoitos, polimorfonucleares (PMN), como quistes, y otras especies de *Entamoeba*. Los trofozoítos de *Entamoeba* generalmente se degeneran rápidamente en muestras fecales no fijadas por lo cual no se recomienda refrigerarlas, en lugar de eso deben preservarse con un fijador, el cual previene la degradación y permite la concentración y tinción permanente. Las sustancias usadas para los procedimientos de concentración incluyen solución de Schaudinn, merthiolate, yoduro-formalina, acetato de sodio-acido acético-formalina (SAF) o solución de formalina al 5 % y 10 %. Otro factor en contra de esta metodología es que se requieren tres muestras fecales obtenidas en 3 días debido a que ese organismo puede ser excretado intermitentemente<sup>21</sup>.

### **1.6.2 Cultivo y Análisis mediante isoenzimas.**

Existen dos tipos de cultivos, el xénico y el axénico. El cultivo xénico está definido como el crecimiento del parásito en presencia de flora indefinida. El cultivo xénico de *E. histolytica* fue introducido por Boeck y Drbohlav en 1925 en medio parcial bifásico de huevo y una modificación de éste (Locke-huevo) es el usado actualmente. Además se han desarrollado variantes con la misma base de huevo,

como el medio de Balamuth, medio de Jones, TYSGM-9 y el medio de Robinson. El cultivo axénico es el cultivo del parásito en ausencia de otros organismos<sup>34</sup>, el cultivo de *E. histolytica* fue realizado por primera vez en 1961 por Diamond<sup>35</sup>. El medio monofásico TP-S-1 fue desarrollado y usado ampliamente para cultivo de *E. histolytica* en diferentes laboratorios de investigación, además de los medios TYI-S-33 y YI-S son ampliamente usados para *E. histolytica*<sup>34</sup>. El cultivo de *E. histolytica* puede realizarse a partir de muestras fecales, biopsia rectal o aspirados de absceso hepático<sup>21</sup>. El cultivo y análisis mediante isoenzima es un método que en un laboratorio de diagnóstico clínico no es viable como un procedimiento de rutina y es menos sensible que la microscopía como método de detección. El cultivo de parásitos es costoso y una labor intensa difícil de mantener en el laboratorio de diagnóstico clínico. El crecimiento de bacterias, hongos u otros protozoarios durante el cultivo es el principal problema, además el cultivo no está recomendado como un procedimiento para detección de especies de *Entamoeba*<sup>34</sup>.

El trabajo pionero de Sargeunt *et al*<sup>36</sup>, demostró que el análisis de isoenzimas de amibas en cultivos permite la diferenciación de las especies de amiba. Un zimodemo es definido como un grupo de cepas de amiba que parte del mismo patrón electroforético y movilidad para algunas enzimas. En *E. histolytica* los zimodemos consisten en las siguientes enzimas: enzima málica, hexocinasa, glucosa-fosfato isomerasa, e isoenzima fosfoglucomutasa<sup>36</sup>. Un total de 24 zimodemos diferentes han sido descritos de los cuales 21 son de aislados humanos (9 para *E. histolytica* y 12 para *E. dispar*), y 3 zimodemos de cepas experimentales han sido reconocidos<sup>37</sup>. Si los zimodemos definidos por bandas estables son contadas, solo tres quedan para *E. histolytica* (II, XIV, y XIX) y una para *E. dispar* (I). El análisis mediante isoenzima (zimodemos) de cultivo de amibas hace posible la diferenciación de *E. histolytica* de *E. dispar* y fue considerada el estándar de oro para el diagnóstico de infección amibiana antes del desarrollo de nuevas técnicas basadas en el DNA<sup>21</sup>.

El análisis mediante zimodemos tiene varias desventajas, incluyendo la dificultad para mantener la realización del test. Es necesario un tiempo considerable de proceso y requiere del cultivo de la amiba para su análisis. Este proceso no siempre tiene éxito. El cultivo de amibas y el posterior análisis mediante isoenzimas es negativo para muchas muestras positivas por microscopía<sup>38</sup>. Tiene las mismas desventajas en cuanto a tiempo y necesidad de personal entrenado para el manejo que la técnica de cultivo.

### **1.6.3 Ensayo de ELISA.**

#### **1.6.3.1 Detección de Anticuerpos.**

El análisis serológico es más útil en países industrializados para la identificación de *E. histolytica* donde es poco común<sup>6</sup>. Sin embargo, en áreas donde la infección es endémica y la gente ha sido expuesta a *E. histolytica*, la capacidad de los análisis serológicos para distinguir entre una infección pasada o una que se está cursando, hace que el diagnóstico sea difícil<sup>57</sup>. La detección de anticuerpos puede ser de ayuda en pacientes con AHA que no tienen parásitos detectables en heces. La sensibilidad en estos casos se acerca al 100 %<sup>39</sup>.

Se han desarrollado diferentes ensayos para la detección de anticuerpos tales como: hemaglutinación indirecta (IHA), aglutinación en látex, inmuno-electroforesis, inmunodifusión, fijación de complemento, ensayo indirecto por inmunofluorescencia (IFA), y ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas<sup>21</sup>.

El ensayo de ELISA es ampliamente usado en los laboratorios de diagnóstico clínico, ya que puede ser usado para epidemiología, en casos de enfermedad asintomática<sup>39</sup> y en el diagnóstico de amibiasis sintomática después del análisis microscópico en muestras fecales. La sensibilidad de este método es de aproximadamente 97 % y una especificidad del 94.8 % en pacientes con AHA. Anticuerpos IgG persisten por años después de una infección por *E. histolytica*, aunque la presencia de anticuerpos IgM es de vida corta y pueden ser detectados

durante la infección cursante<sup>21</sup>. Las ventajas de este ensayo son la rapidez de realización del test y que no existe reacción cruzada con otros parásitos<sup>40</sup>.

La hemaglutinación indirecta (IHA) es usada en el diagnóstico de amibiasis invasiva en pacientes infectados con VIH, esto debido a la disminución de linfocitos T. Los linfocitos T están implicadas en la respuesta de memoria (anticuerpos IgG) importante para los procesos de infección sistémica por *E. histolytica*. La detección de anticuerpos mediante un test serológico puede dificultar el diagnóstico. En estos casos el diagnóstico por IHA es de gran utilidad ya que su especificidad es alta (99.1 %) en pacientes VIH positivos con síntomas gastrointestinales<sup>41</sup>. También se ha observado que la sensibilidad de IHA en pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) es de 72 % en pacientes con 1 a 2 semanas después de mostrar los síntomas, y del 86.9 % al final de la tercer semana<sup>42</sup>.

### **1.6.3.2 Detección de antígenos.**

Se han desarrollado ensayos mediante ELISA para la detección de antígenos en muestras fecales. La sensibilidad de esos ensayos es cercana a la de cultivo de heces y es mucho más rápida de realizar. Estos ensayos usan anticuerpos monoclonales contra la lectina Gal/GalNac, específica de *E. histolytica*, o anticuerpos monoclonales contra antígenos ricos en serina del mismo parásito<sup>21</sup>. La lectina Gal/GalNac es altamente inmunogénica y esta muy conservada. Debido a las diferencias antigénicas entre las lectinas de *E. dispar* y *E. histolytica* se puede hacer la diferenciación. El nivel de detección de antígenos amibianos es muy alto requiriendo aproximadamente 1000 trofozoítos por pozo<sup>43,44</sup>. Sin embargo estos test tienen la desventaja de que los antígenos detectados son desnaturalizados por fijación de la muestra de heces, además la prueba se limita a muestras frescas o congeladas. Aún así estos ensayos han demostrado una sensibilidad y especificidad de cerca del 95 %<sup>45,46</sup>.

#### **1.6.4 Ensayo inmunocromatográfico.**

Este ensayo detecta simultáneamente a *Giardia lamblia*, *E. histolytica*/*E. dispar* y *Cryptosporidium parvum*. El TPP (Triade parasite panel) panel de detección de triada parasitaria es el primer kit inmunocromatográfico, éste ensayo usa anticuerpos monoclonales específicos para un antígeno de superficie (29 kDa) para *E. histolytica*; *G. lamblia*, alfa-1-giardina; y una proteína disulfuro isomerasa para *Cryptosporidium parvum*. La ventaja del TPP es que puede realizarse en aproximadamente 5 minutos con muestras de heces frescas o congeladas que no hayan sido fijadas. La desventaja más importante es que no puede diferenciarse entre *E. histolytica* y *E. dispar*<sup>21</sup>.

#### **1.6.5 Diagnóstico basado en DNA.**

Debido a los diferentes problemas que se tienen para el diagnóstico basado en la microscopía o el cultivo es preferible un diagnóstico basado en biología molecular. Las ventajas son una mayor sensibilidad, especificidad y simplicidad. Dentro de las desventajas debe considerarse que es una metodología que emplea reactivos de alto precio, requiere personal entrenado y equipo de laboratorio también de costo elevado, además el riesgo de contaminación esta latente (excepto en PCR de tiempo real).<sup>21</sup>

##### **1.6.5.1 PCR.**

En la última década se han publicado muchos trabajos con metodologías basadas en DNA para detectar virus, bacterias o parásitos, teniendo como constante lo difícil que resulta trabajar con muestras fecales. Este tipo de muestras están entre las más complejas para realizar un análisis directo por PCR debido a la presencia de inhibidores, tales como bilirrubinas, sales biliares y carbohidratos complejos. Gracias al desarrollo de ensayos que evitan los efectos de estos inhibidores se pueden trabajar muestras fecales con buenos resultados<sup>21,47,48</sup>.

La metodología de PCR tiene diversas aplicaciones clínicas dentro de las cuales podemos señalar: detección de DNA viral, de bacterias, hongos y parásitos

en muestras de muy diversas fuentes, en nuestro caso se partió de muestras fecales. Esta metodología tiene como característica principal la amplificación de DNA a partir de una cantidad muy pequeña de muestra, donde es posible que a partir de un femtogramo o el equivalente a un décimo de DNA de un parásito sea amplificado<sup>21</sup>. En esta técnica se desarrollan cebadores, que son oligonucleótidos iniciadores específicos, que contienen la información inicial que le permite a la polimerasa iniciar la reacción que dará como resultado la amplificación de las secuencias que serán objeto de identificación, las cuales son en casi todos los casos específicas de la especie a la cual se esté identificando.

La técnica de PCR consta de 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. La identificación de las secuencias amplificadas es realizada en geles de agarosa al 2 % o bien en geles de poliacrilamida al 1 %.

*E. histolytica* puede ser identificada en una gran variedad de muestras, como heces, tejidos, aspirado de absceso hepático, etc. La PCR en la que se amplifica la subunidad pequeña del gen para rRNA (18 rDNA) está reportado como aproximadamente 100 veces más sensible que el mejor kit de ELISA existente<sup>44,49</sup>.

Edman *et al* usaron la PCR para amplificar el gen que codifica para el antígeno de superficie (125 kDa) y subsecuentemente fue usado para distinguir entre las especies de *Entamoeba* mediante enzimas de restricción<sup>30,50</sup>. Posteriormente se han empleado diferentes métodos basados en la PCR y con una amplia variedad de genes para amplificar.

#### **1.6.5.2 PCR en tiempo real.**

Es una metodología que tiene amplias aplicaciones, especialmente en enfermedades infecciosas. Se elimina el análisis post-PCR llevando a una reducción de los tiempos de proceso y del riesgo de contaminación del amplificado así como una reducción de los costos. Este ensayo permite detectar específicamente el amplificado por unión con uno o dos marcadores fluorescentes como LC-Rojo 640 y fluoresceína marcada<sup>51</sup>.

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de cebadores empleados en PCR y los genes a amplificarse.

| Tipo de Ensayo de PCR   | Gen objetivo              | Tamaño del producto amplificado | Cebadores           | Secuencia                  |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Paso sencillo           | DNA altamente repetitivo  | 145                             | EHP1 <sup>a</sup>   | TCAAAATGGTCGTCGTCTAGGC     |
|                         |                           |                                 | EHP2 <sup>a</sup>   | CAGTTAGAAATTATTGTACTTTGTA  |
|                         | Subunidad pequeña de rRNA | 133                             | EHNP1 <sup>b</sup>  | GGATCCTCCAAAAATAAAGT       |
|                         |                           |                                 | EHNP1 <sup>b</sup>  | CCACAGAACGATATTGGATACC     |
| Duplex de paso sencillo | Cisteína proteinasa       | 242                             | Ehcp6F <sup>a</sup> | GTTGCTGCTGAAGAACTTG        |
|                         |                           |                                 | Ehcp6R <sup>a</sup> | GTACCATAACCAACTACTGC       |
| Anidado                 | Subunidad pequeña de rRNA | 135                             | EH1 <sup>a</sup>    | GTACAAAATGGCCAATTCATTCAATG |
|                         |                           |                                 | ED1 <sup>b</sup>    | TACAAAGTGGCCAATTTATGTAAGTA |
|                         |                           |                                 | EHD 2 <sup>c</sup>  | ACTACCAACTGATTGATAGATCAG   |
| Multiplex               | Subunidad pequeña de rRNA | 166                             | Enta F <sup>d</sup> | ATGCACGAGAGCGAAAGCAT       |
|                         |                           |                                 | Ehr <sup>d</sup>    | GATCTAGAAACAATGCTTCTCT     |
|                         |                           | 752                             | Edr <sup>d</sup>    | CACCACTTACTATCCCTACC       |
|                         |                           |                                 | Emr <sup>d</sup>    | TGACCGGAGCCAGAGACAT        |
| 580                     |                           |                                 |                     |                            |

**TABLA 1.** Ejemplos de cebadores usados en PCR convencional para *E. histolytica* y *E. dispar*. **a** Específico para *E. histolytica*. **b** Específico para *E. dispar*. **c** Específico para *E. histolytica* y *E. dispar*. **d** Específico para *E. moshkovskii*. Tomado de R. Fotedar *et al.* Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species<sup>21</sup>.

## 1.7 Tratamiento.

Actualmente los medicamentos empleados en el tratamiento de la amibiasis son muy variados: los principios activos tienen como base principalmente a los derivados de nitroimidazol, por ejemplo: metronidazol tinidazol y ornidazol<sup>12</sup>. Otros compuestos empleados son las Dicloroacetamidas (como la etofamida, cefamida, diloxamida, teclozán), la quinoleína (diyodohidroxiquinoleína, cloroquina)<sup>7</sup> y la nitazoxanida.

La nitazoxanida es un tiazol contra bacterias anaeróbicas y parásitos. En la circulación se activa su metabolito la tizoxanida, compuesto más fuerte que el metronidazol y particularmente más potente en los casos donde esta presente alguna cepa resistente al metronidazol<sup>61</sup>.

En el siguiente cuadro se presentan los compuestos mayormente usados en el tratamiento de la amibiasis:

| Compuesto                | Mecanismo de acción  | Eficacia Clínica  | Efectos adversos   | Comentarios   |
|--------------------------|--|---|--|---|
| Metronidazol o tinidazol | Se activa en organismos anaerobidos por reducción del grupo 5-nitro. El metabolito activado daña el ADN. | Altamente efectivo  | Diarrea, nausea, sabor de boca metálico, gastritis, cefalea, leucopenia transitoria y alergia          | Empleado en colitis amibiana y ALA.   |
| Dehidroemetina           | Inhibe la síntesis de proteínas  | Rápida actividad amebicida  | Cardiotoxicidad, diarrea, nausea, vómito,  | Se emplea en colitis amibiana fulminante y algunos casos de ruptura de ALA en combinación con metronidazol. |
| Paramomicina             | Aminoglicósido. Inhibe la síntesis de proteínas  | Casi no se absorbe en la luz del intestino; posee un margen amplio de seguridad | Nausea, vomito y diarrea, daño en nervio óptico y neuropatía periférica.                               | Se emplea en infección amibiana a nivel de la luz intestinal.   |
| Diloxamida               | Bloqueo de síntesis de proteínas   | Casi no se absorbe en la luz del intestino; posee un margen amplio de seguridad | Flatulencia  | Se emplea en infección amibiana a nivel de la luz intestinal.   |
| Iodoquinol               | Desconocido  | Casi no se absorbe en la luz intestinal   | Dolor de cabeza, nausea, vómito  | Se emplea en infección amibiana a nivel de la luz intestinal.   |
| Nitazoxanida             | Acción sobre la piruvato ferredoxin Oxido reductasa (POF)  | Se absorbe rápidamente en el epitelio intestinal                                | Dolor abdominal, nausea, diarrea, cefalea y vómito. Contraindicado en hipersensibilidad a salicilatos. | Se emplea en casos donde hay resistencia a metronidazol.  |

**TABLA 2.** Algunos medicamentos empleados en el tratamiento de colitis amibiana y ALA. Tomado de Stanley L. Samuel Jr. Amoebiasis (Seminar). *The Lancet Vol 361, 2003.* 1025 – 1034.

## **2.- JUSTIFICACIÓN.**

La técnica de PCR es notablemente mayor en sensibilidad y especificidad que el análisis por microscopía, para el diagnóstico de *E. histolytica* y *E. dispar* por lo cual se empleo en esta investigación. Ambas metodologías requieren de personal entrenado, en el caso de microscopía la experiencia tiene un papel más importante, ya que los quistes pueden ser fácilmente confundidos con otros cuerpos tales como restos de almidón o trofozoítos.

La población para realizar este trabajo fue seleccionada en base condiciones de vivienda, alimentación y estado de salud por las cuales se presentan infecciones y re-infecciones por *E. histolytica*.

## **3.- OBJETIVO.**

Realizar el diagnóstico de *E. histolytica* y *E. dispar* en una población infantil mediante un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de un solo paso) en muestras fecales.

### Objetivos Particulares

- 1) Extracción y purificación de DNA de los quistes de *E. histolytica* y *E. dispar* presentes en heces de niños de dos albergues: uno localizado en la comunidad de Kírare en el municipio de Batopilas, y el otro en la comunidad de Sehuérachi en el municipio de Guachochi, ambos localizados en la sierra Tarahumara, en el estado de Chihuahua.
- 2) Llevar a cabo la amplificación de dos fragmentos de 752 pares de bases (*E. dispar*) y de 166 pares de bases (*E. histolytica*)
- 3) Analizar en geles de agarosa al 1.0 % los productos de amplificación en busca de los fragmentos de 752 pares de bases (*E. dispar*) y 166 pares de bases (*E. histolytica*) con la finalidad de realizar un diagnóstico diferencial.

#### **4. METODOLOGÍA.**

Se recibieron 199 muestras fecales que fueron tomadas de una población infantil dos albergues: Sehuérachi (localizado en el municipio de Batopilas) y Kírare (localizado en el municipio de Guachochi). Ambos municipios localizados en la sierra Tarahumara, al sur del estado de Chihuahua (FIG. 4). Las edades de los niños eran de 6 a 14 años, los cuales llegan a los albergues en temporada de invierno para recibir atención médica y alimentación. Las muestras fueron tomadas de todos los niños presentes en los albergues presentes en la temporada invernal.

El albergue Sehuérachi está localizado en el municipio de Guachochi, cuya cabecera municipal cuenta con todos los servicios básicos e incluso cuenta con un aeropuerto. Este albergue se localiza al norte de la cabecera municipal, pero el acceso es muy complicado ya que no existen caminos pavimentados y las condiciones son muy precarias. Cuentan con una cocina desprovista de gas y electricidad, y el agua no esta disponible. En este albergue se atienden a 122 niños aproximadamente, procedentes tanto de la comunidad de Sehuérachi como de comunidades aledañas.

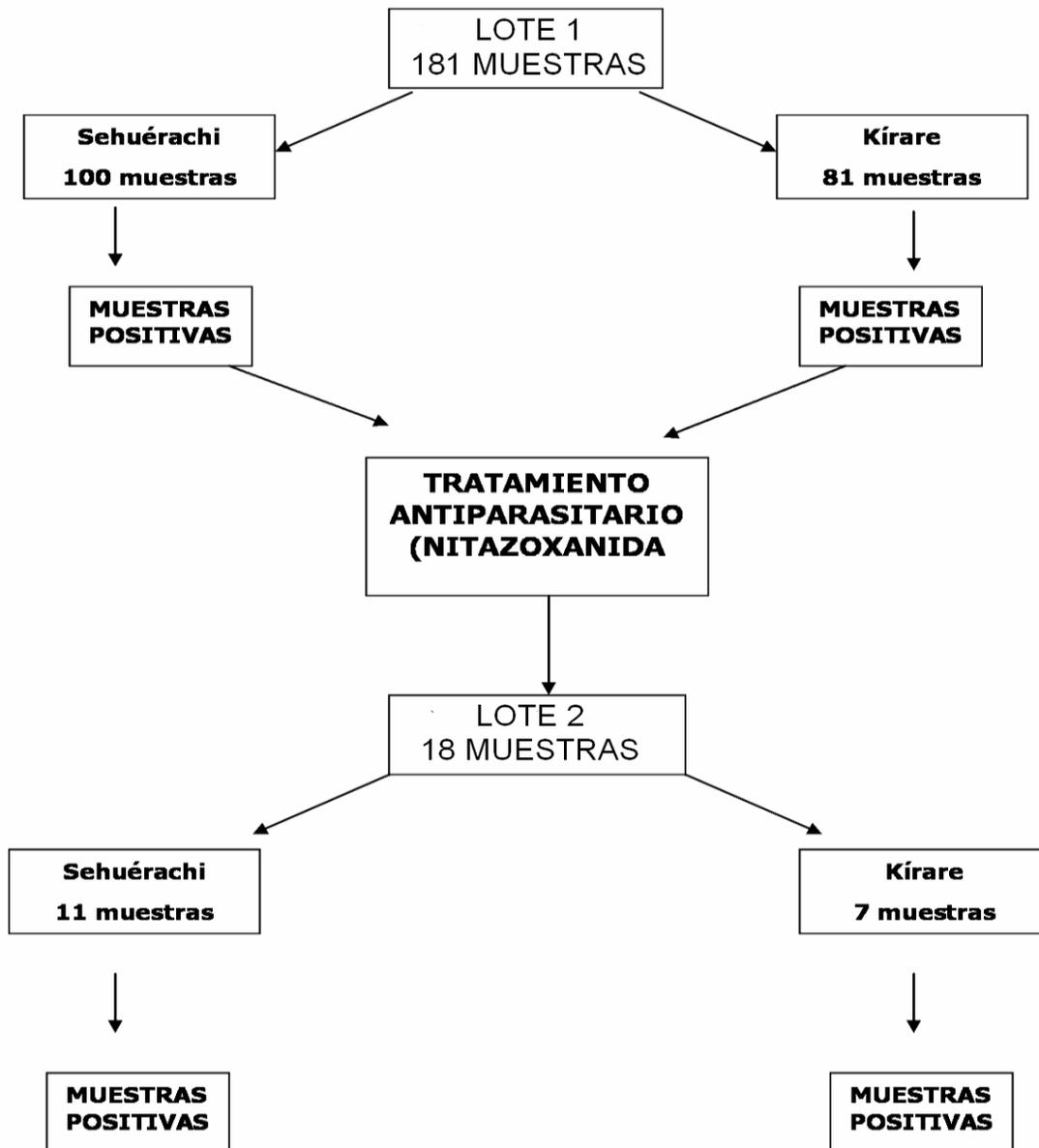
Al albergue de Kírare, localizado en el municipio de Batopilas, este albergue atiende a aproximadamente 100 niños provenientes de las comunidades aledañas. A este albergue se puede llegar por caminos pavimentados a diferencia del albergue Sehuérachi. Este albergue cuenta con servicios básicos de agua, gas y electricidad

Se recolectaron de 2 a 3 gramos de heces de cada niño y se almacenaron en recipientes de plástico a una temperatura de 5° C para su transporte al Hospital General de la Ciudad de México. Debido a lo difícil del acceso, solo se disponía de material y transporte para realizar una sola toma por paciente.

Las 199 muestras provenientes de los dos albergues fueron enviadas en dos lotes. El Lote 1 que consistió en 181 muestras; Sehuérachi envió 100 muestras y Kírare envió 81 muestras. Se reportaron los resultados obtenidos y se realizó un tratamiento antiparasitario.

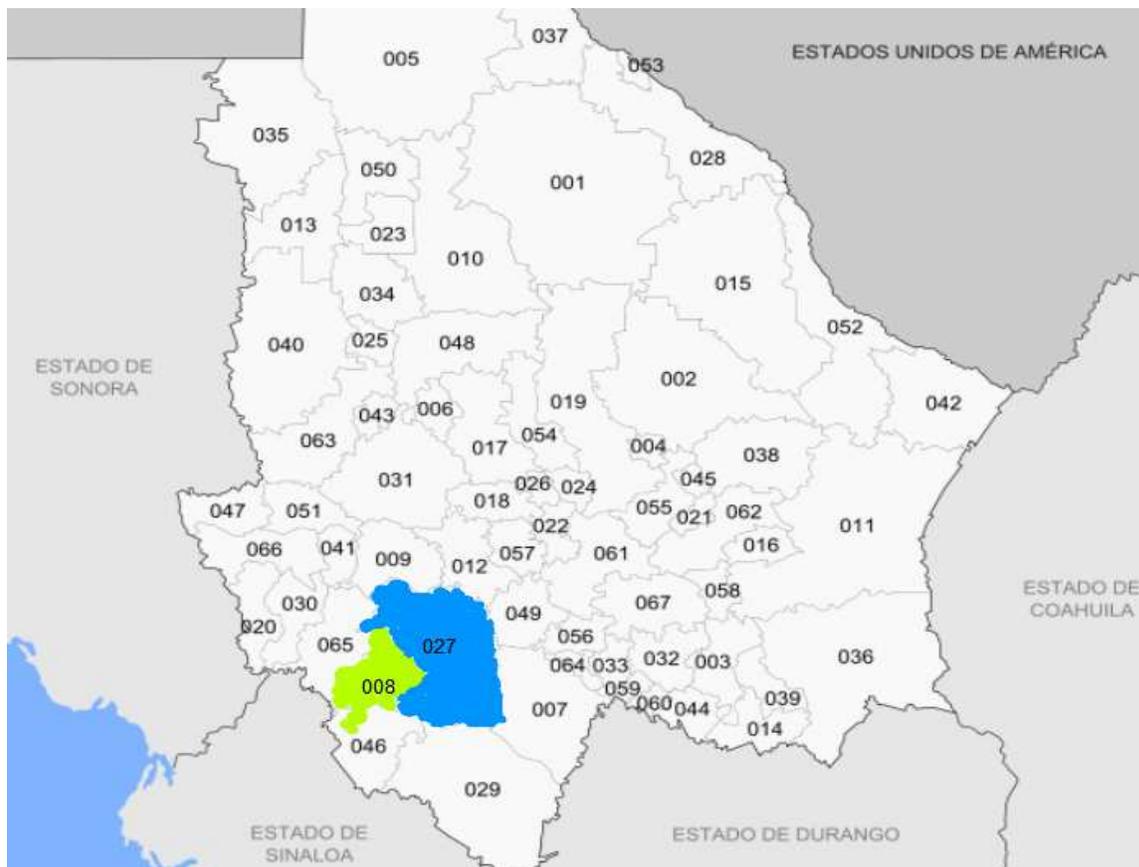
Se recibió el Lote 2 posterior al tratamiento antiparasitario, que consistió en 18 muestras, de las cuales 11 muestras provenían del albergue Sehuérachi y 7 muestras de Kírare.

Distribución de las muestras:



Los cebadores empleados en el ensayo por PCR fueron oligonucleótidos EntaF, EhR y EdR. El oligonucleótido sentido (EntaF) se sintetizó a partir de la región central de la subunidad pequeña del gen de RNA ribosomal y fue la misma para las dos especies, *E. histolytica* y *E. dispar*. En el caso de los oligonucleótidos antisentido EhR (específico para *E. histolytica*) y EdR (específico para *E. dispar*) se diseñaron a partir de cada una de sus subunidades pequeñas de RNA ribosomal, específicas de cada especie. Los productos de este ensayo fueron secuencias de 166 pb para *E. histolytica* y de 780 pb para *E. dispar*. El DNA para los controles positivos fueron tomados de las cepas HM-1:IMSS para *E. histolytica* y para *E. dispar* SAW 760.

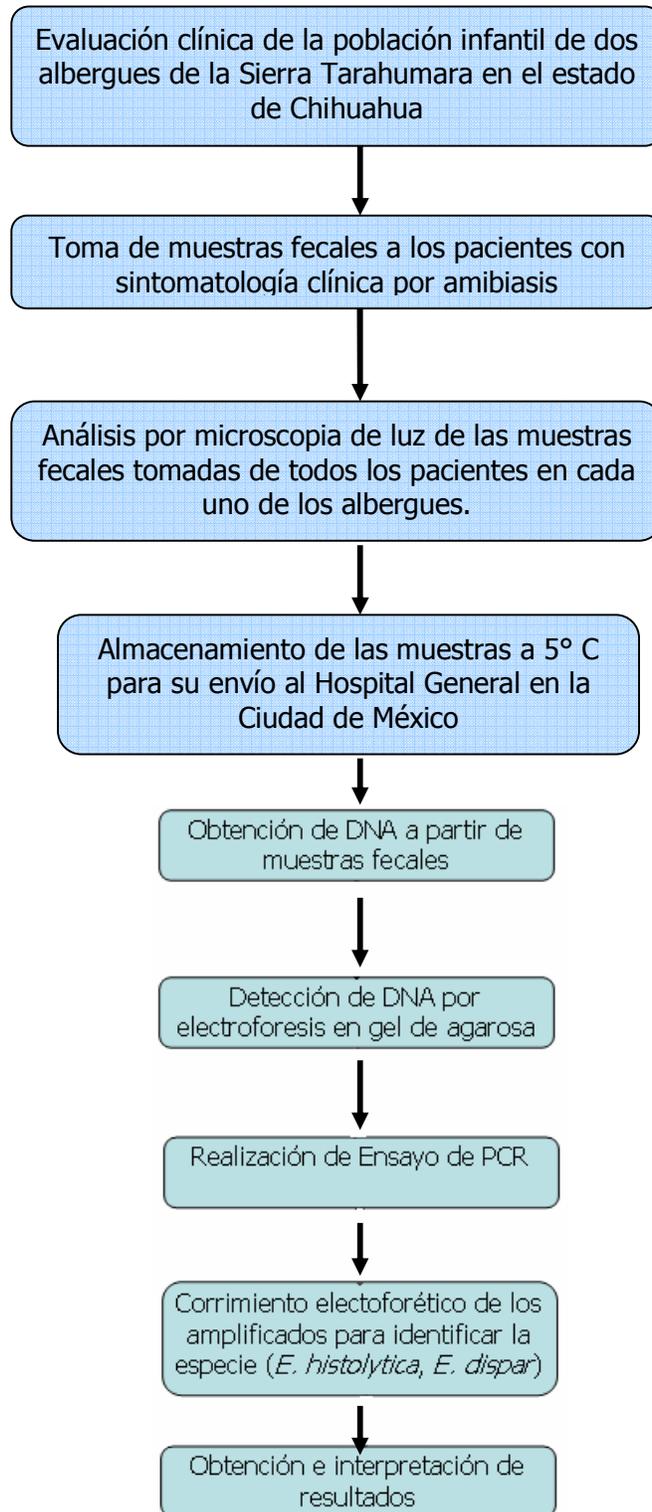
Ubicación geográfica de los municipios Guachochi y Batopilas en el estado de Chihuahua:



**FIGURA 4.** Municipio de Guachochi (027) y Municipio de Batopilas (008)

#### 4.1 Diagrama de flujo.

El siguiente diagrama muestra el proceso desde la toma de muestra hasta la obtención de los resultados positivos por PCR.



#### **4.1.1 Materiales y Métodos.**

Extracción de DNA a partir de las muestras fecales almacenadas a 5° C, las cuales fueron positivas a *E. histolytica*/*E. dispar* por microscopía. La extracción se realizó con el kit **QIAamp stool DNA extraction kit** (QIAGEN, Hilden, Alemania).

La extracción se llevó a cabo de la siguiente forma:

Pesar 180-200 mg de muestra en un tubo para microcentrífuga de 2 ml y colocarlo en un recipiente con hielo. Si la muestra es líquida, colocar 200 µl dentro de un tubo de 2 mL. Adicionar 1.4 ml de buffer ASL para cada muestra. Agitar continuamente por 1 minuto o hasta que la muestra este completamente homogénea. Calentar la suspensión durante 5 minutos a 70° C. Agitar durante 15 segundos y centrifugar a 13 076 g durante 1 minuto para sedimentar las partículas de la muestra. Pasar 1.2 ml del sobrenadante dentro de un tubo para microcentrífuga de 2 ml y eliminar el tubo con el sedimento. Adicionar una tableta InhibitEX a cada muestra y agitar inmediata y continuamente durante 1 minuto hasta que la tableta este completamente disuelta. Incubar la suspensión durante 1 minuto a temperatura ambiente para dejar que los inhibidores se absorban a la matriz de la tableta InhibitEX. Centrifugar la muestra a 13 076 g durante 3 minutos para sedimentar los inhibidores unidos a InhibitEX. Colocar todo el sobrenadante en un nuevo tubo y desechar el sedimento. Centrifugar la muestra a 13 076 g durante 3 minutos. Colocar 15 µl de Proteinasa K dentro de un tubo de microcentrífuga y adicionar 200 µl de sobrenadante. Adicionar 200 µl de Buffer AL y agitar durante 15 segundos. Es importante no adicionar la Proteinasa K directamente al Buffer AL. Es esencial que la muestra y el Buffer AL estén completamente mezclados para formar una solución homogénea. Incubar a 70 °C durante 10 minutos. Adicionar 200 µl de etanol absoluto al lisado y mezclar por agitación. Etiquetar la tapa de una columna QIAamp y colocarla en un tubo recolector de 2 ml. Colocar el lisado completo dentro de la columna QIAamp sin

humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar 1 minuto a 13 076 g. Colocar la columna QIAamp en un nuevo tubo colector, y desechar el tubo que contiene el filtrado. Abrir la columna QIAamp y adicionar 500 µl de Buffer AW1. Centrifugar a 13 076 g durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp en un nuevo tubo colector de 2 ml y desechar el tubo que contienen el filtrado. Abrir la columna QIAamp y adicionar 500 µl de Buffer AW2. Centrifugar a 13 076 g durante 3 minutos. Desechar el tubo que contiene el filtrado. Transferir la columna QIAamp dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL etiquetado y colocar 200 µl de Buffer AE directamente dentro de la membrana QIAamp. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugar a 13 076 g durante 1 minuto para eluir el DNA.

Se realizó un ensayo electroforético para detectar el DNA en cada muestra y se almacenaron las muestras obtenidas a -20° C para la realización del ensayo de PCR.

Los controles positivos consistieron en DNA extraído de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS y *E. dispar* cepa SAW.

Se realizó un cálculo de porcentajes para determinar la frecuencia de *E. dispar* y *E. histolytica* en la población analizada. Se calculo la prevalencia y se realizó un comparativo entre los resultados obtenidos en el Lote 1 y los resultados del Lote 2.

#### **4.2 Ensayo de PCR.**

Diseño de los cebadores utilizados en el PCR. Se emplearon los siguientes oligonucleotidos sintetizados a partir de la información proporcionada en el artículo de Zuhainan Hamzah *et al.* 2006<sup>47</sup>. Estos cebadores fueron diseñados en base a lo reportado por Graham Clark *et al.* del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la London School of Higiene and Tropical Medicine, Londres, Inglaterra. Estos cebadores se sintetizaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Cebador sentido: EntaF, 5\_-ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT-3

---

Diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en heces de niños de dos albergues de la Sierra Tarahumara.

Flavio Germán Sánchez Monroy

Cebadores antisentido: para EhR (*E. histolytica*) 5\_-GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T-3\_; y para EdR (*E. dispar*) 5\_-CAC CAC TTA CTA TCC CTA CC-3\_;

El cebador antisentido EhR (*E. histolytica*) genera un producto de 166 pb, y el cebador antisentido EdR (*E. dispar*) genera un producto de 752 pb<sup>7</sup>.

El cebador sentido EntaF es una secuencia conservada de una región central del gen que codifica para la subunidad pequeña de RNA ribosomal, las demás subunidades son secuencias características para cada amiba.

#### **4.2.1 Mezcla de reacción.**

Los reactivos empleados y sus respectivas concentraciones fueron las siguientes:

- 5 µL Buffer 10X
- 200 mM de cada desoxiribonucleosido trifosfatado (dNTP)
- 0.1 µM de cada cebador (sentido y antisentido)
- 6 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 UI de Taq Polimerasa
- 1x Taq Buffer.
- 10 µl de muestra de DNA extraído.

Todos los reactivos empleados fueron adquiridos a Roche Diagnostics.

#### 4.2.2 Amplificación.

Se llevó a cabo en el Termociclador "2720 Thermal Cycler" de Applied Biosystems los ciclos de amplificación fueron las siguientes:

Desnaturalización: 94° C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 58° C por 1 minuto y 72° C durante 1 minuto, con una extensión final a 72° C durante 7 minutos.

| Temperatura | Tiempos   |             |
|-------------|-----------|-------------|
| 94 ° C      | 3 minutos |             |
| 94 ° C      | 1 minuto  | } 30 ciclos |
| 58 ° C      | 1 minuto  |             |
| 72 ° C      | 1 minuto  |             |
| 72 ° C      | 7 minutos |             |

Se generaron productos de PCR de aproximadamente: 166 bp, específico para *E. histolytica* y un producto de 752 pb específico para *E. dispar*. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % y posteriormente teñida con bromuro de etidio (3.3 µ de Bromuro por cada 80 mL de agua destilada).

#### 4.2.3. Electroforesis en gel para detección del DNA amplificado.

Preparar una solución 1x de TAE a partir de una solución concentrada 50 X (ver apéndice).

Medir 20 ml de solución TAE 50 X y aforar con agua destilada a 1000 mL.

Preparación de la Electroforesis.

- Mezclar 5.0 µl de muestra de DNA amplificado, 5.0 µl de agua destilada y 1.0 µl de buffer de tinción (azul de bromofenol) colocar la mezcla en los canales del gel de agarosa al 1.0 %.

---

Diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en heces de niños de dos albergues de la Sierra Tarahumara.

Flavio Germán Sánchez Monroy

- Agregar en el primer canal el marcador de peso molecular ADN pBR322/Msp I.
- Colocar la solución con el DNA amplificado en los canales del gel. Aplicar un voltaje de 84 – 90 volts durante 40 minutos.
- Colocar el gel de agarosa al 1.0 % en una solución de bromuro de Etidio durante 10 minutos y enjuagar durante 5 minutos en agua.
- Se colocaron los geles en la cámara de rayos UV para obtener la fotografía para su posterior análisis.

## 5. RESULTADOS.

Fue desarrollado un ensayo de PCR de paso sencillo para detectar y diferenciar las dos especies: *E. histolytica*/*E. dispar*, las cuales son morfológicamente iguales tanto en forma de trofozoíto como en quiste.

Un cebador sentido, altamente conservado, fue diseñado a partir de la mitad de la subunidad pequeña del gen de rRNA, y el cebador anti-sentido fue diseñado a partir de secuencias específicas para cada una de las dos especies *E. histolytica* y *E. dispar*.

EL PCR generó los siguientes amplificados:

- *E. histolytica* 166 pb.
- *E. dispar* 752 pb.

### 5.1 Resultados LOTE 1.

Se recibieron en total 181 muestras. Sehuérachi envió 100 muestras positivas por microscopia para *E. histolytica* /*E. dispar* y Kírare envió 81 muestras también positivas por microscopia para *E. histolytica* /*E. dispar*.

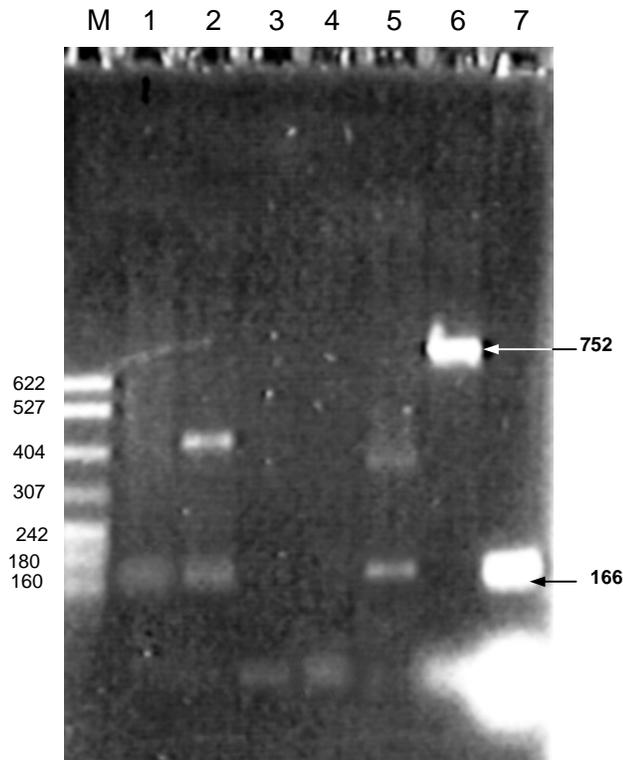
Al total de las 181 muestras positivas para *E. histolytica* /*E. dispar* se les realizó el ensayo de PCR. Los resultados obtenidos por PCR fueron los siguientes:

En la fig. 5 se muestra un gel de agarosa al 1.0 % donde se analizó el producto de PCR de las muestras provenientes de albergue Kírare.

Se puede apreciar que se encuentran positivas para *E. histolytica* las muestras 1 y 2 así como la muestra 5 donde observamos el amplificado de un fragmento de 166 pb. específico para esta especie, el cual no se observó en los otros carriles. No se encontró el amplificado de 752 pb. específico para *E. dispar* en ningún carril.

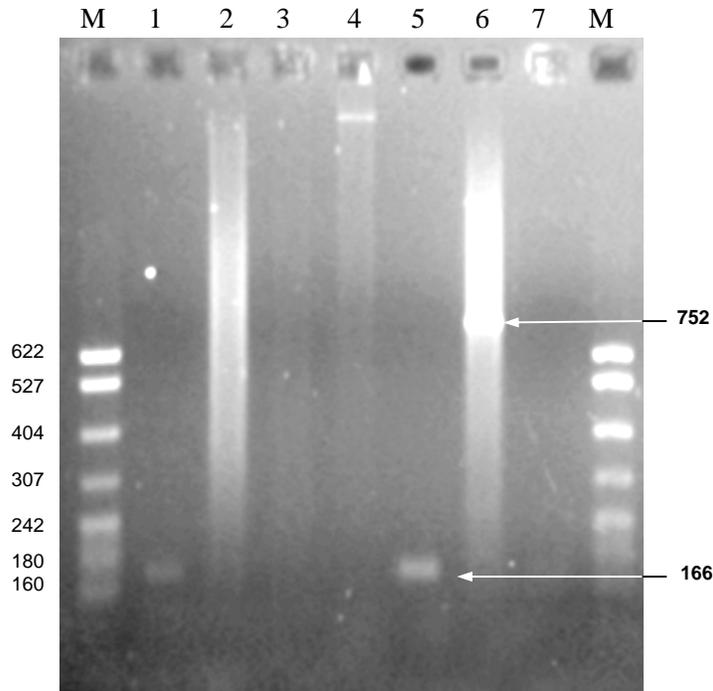
Diagnóstico diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en heces de niños de dos albergues de la Sierra Tarahumara.

Flavio Germán Sánchez Monroy



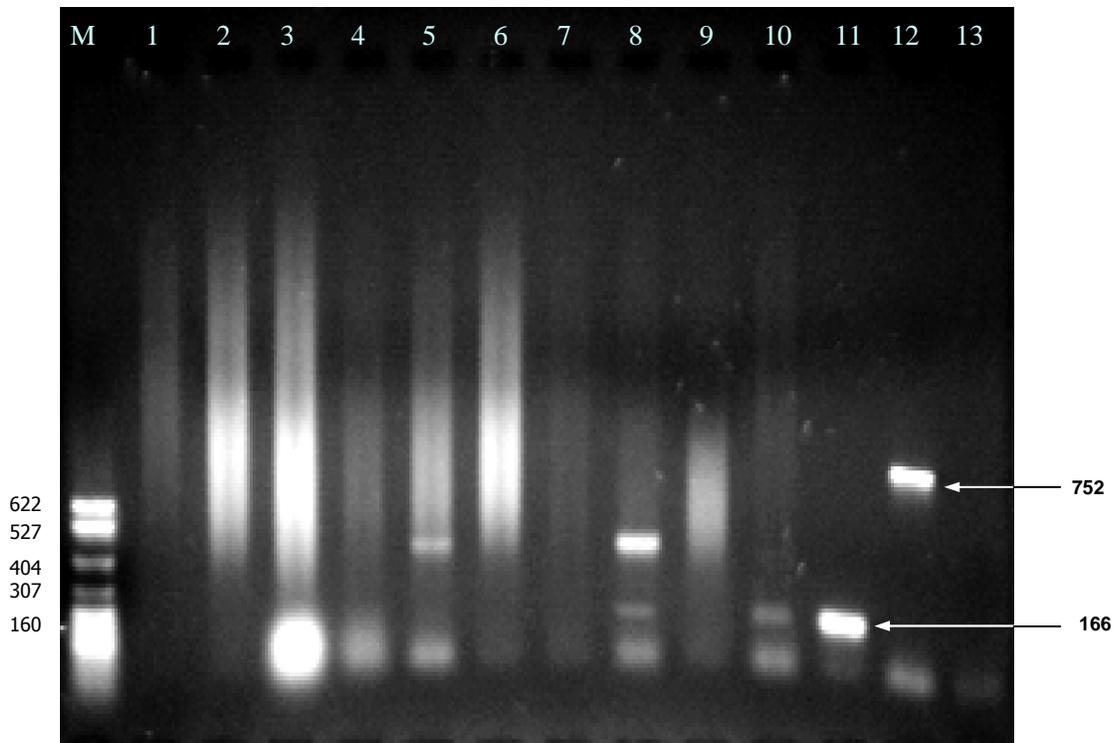
**Figura 5.** Resultados de los amplificados de las Muestras 1, 2, 3, 4 y 5: 1) muestra 1, 2) muestra 2, 3) muestra 3, 4) muestra 4, 5) muestra 5; controles: 6) control positivo para DNA de *E. dispar* y 7) control positivo para DNA de *E. histolytica*.

En La figura 5 se aprecia que Las muestras 1 (carril 1), 2 (carril 2) y 5 (carril 5) están positivas para *E. histolytica*.



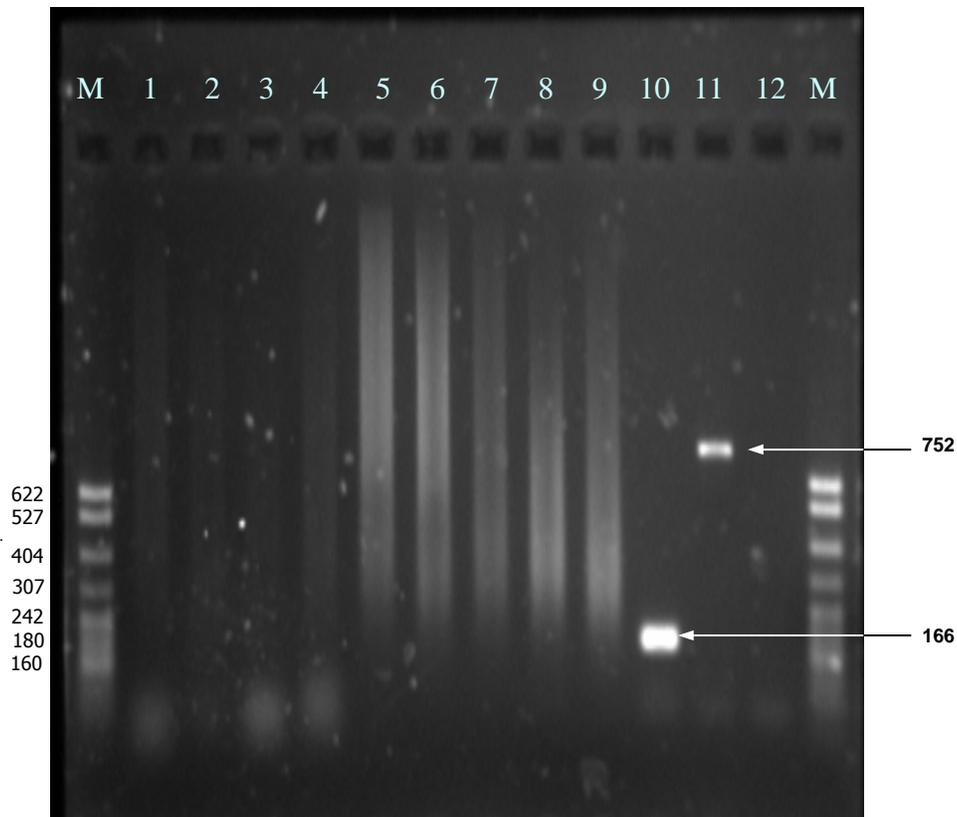
**Figura 6.** Resultados de los amplificados de las Muestras 6, 19, 40 y 88: 1) muestra 6, 2) muestra 19, 3) muestra 40, 4) muestra 88, controles: 5) control positivo *E. histolytica*, 6) control positivo para *E. dispar* y 7) control negativo (agua). En esta corrida la muestra 6 (carril 1) esta positiva para *E. histolytica*.

La figura 6 muestra el corrimiento electroforético donde se observa que en el carril 1 (muestra 6) amplificó el fragmento de 166 pb positivo para *E. histolytica*.



**Figura 7.** Resultados de los amplificados de las Muestras 253, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 301, 268 y 302: 1) muestra 253, 2) muestra 260, 3) muestra 262, 4) muestra 263, 5) muestra 264, 6) muestra 265, 7) muestra 266, 8) muestra 301, 9) muestra 268, 10) muestra 302, controles: 11) control positivo para DNA de *E. histolytica*. 12) control positivo para DNA de *E. dispar*, 13) agua (control negativo).

En la figura 7 se muestra la esta corrida donde la muestra 301 (carril 8) y la muestra 302 (carril 10) están positivas para *E. histolytica*.



**Figura 8.** Resultados de los amplificados de las Muestras 262, 280, 289, 300, 310, 311, 316, 319 y 321: 1) muestra 262, 2) muestra 280, 3) muestra 289, 4) muestra 300, 5) muestra 310, 6) muestra 311, 7) muestra 316, 8) muestra 319, 9) muestra 321, controles: 10) control positivo para DNA de *E. histolytica*. 11) control positivo para DNA de *E. dispar*, 12) agua (control negativo).

En la figura 8 se muestra una corrida donde no hubo muestras positivas. La muestra 262 se repitió debido a que en el gel de la figura 5 esta dudoso.

De las 181 muestras del lote 1 solo amplificaron 18 (9.94 %) para el fragmento de 166 pb que corresponde a *E. histolytica*, las 163 muestras restantes (90.06 %) fueron negativas para *E. dispar* y *E. histolytica*.

Los resultados por cada albergue se presentan en la tabla 3, en la que se muestran los resultados positivos y negativos clasificados para cada albergue. Se observa que para el albergue Kírare fueron 11 muestras positivas para *E. histolytica* que corresponde a un 6.08 %, porcentaje mayor al obtenido para el albergue Sehuérachi para *E. histolytica* (3.86 %) aunque este haya enviado un

mayor número de muestras. Como ya se mencionó, no se obtuvieron resultados positivos para *E. dispar*.

| ALBERGUE   | Número de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> |          | Número de muestras positivas para <i>E. dispar</i> |     | NEGATIVAS | TOTAL       |
|------------|---|----------|--|-----|-----------|-------------|
| KÍRARE     | 11  | (6.08 %) | 0  | 70  | (38.68 %) | 81          |
| SEHUERACHI | 7   | (3.86 %) | 0  | 93  | (51.38 %) | 100         |
| Total      | 18  | (9.94 %) | 0  | 163 | (90.06 %) | 181 (100 %) |

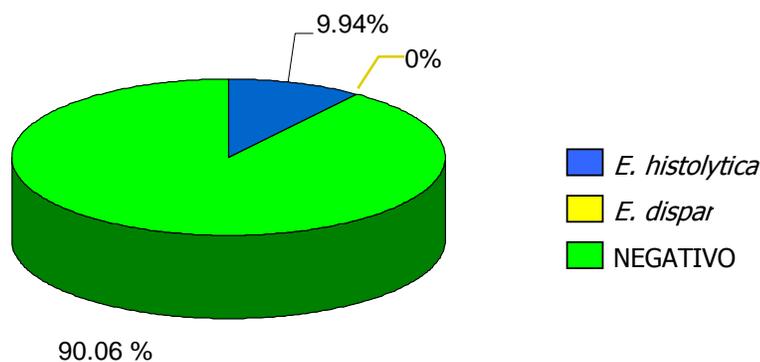
**TABLA 3.-** Resultados totales por Albergue para el Lote 1, nótese que no se presentaron resultados positivos para *E. dispar*.

En la tabla 4 se muestran los resultados globales positivos para *E. histolytica*/*E. dispar*. Como ya se mencionó, no se obtuvieron resultados positivos para *E. dispar*.

| ESPECIE               | POSITIVAS   | NEGATIVAS    | TOTAL DE MUESTRAS |
|-----------------------|-------------|--------------|-------------------|
| <i>E. histolytica</i> | 18 (9.94 %) | 163 (90.06%) | 181 (100 %)       |
| <i>E. dispar</i>      | 0 (0.0 %)   |              |                   |

**TABLA 4.** Resultados globales por PCR de ambos albergues para el Lote 1.

**Resultados globales para los albergues Kírare y Sehuérachi Lote 1**

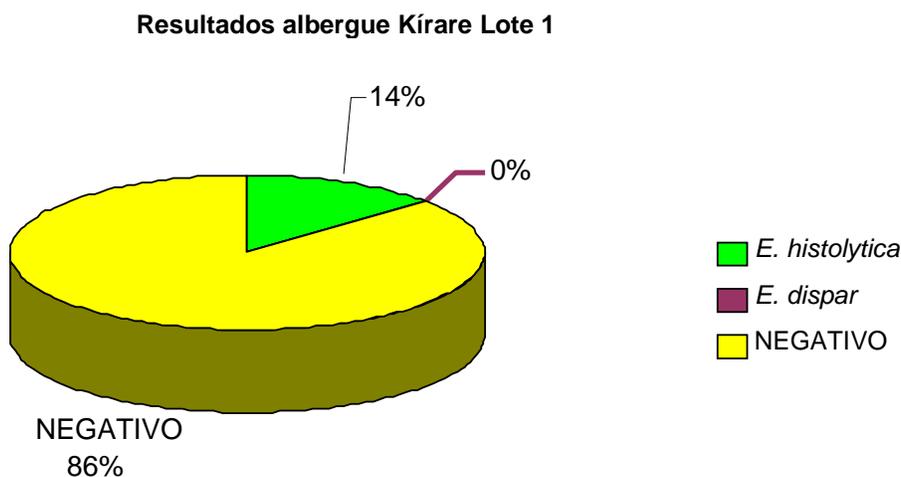


**GRAFICO 1.** Gráfica de pastel que muestra los resultados para *E. histolytica*/*E. dispar* globales absolutos en porcentajes del Lote 1 para ambas comunidades.

De las 81 muestras que enviaron del albergue Kírare se obtuvieron 11 positivas para *E. histolytica* que corresponden al 14 % considerando a las 81 muestras como un 100% (TABLA 5). Este porcentaje es mucho mayor al obtenido en relación al total de los dos albergues, mostrado en la TABLA 4.

| ALBERGUE | Número de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> | Número de muestras positivas para <i>E. dispar</i> | NEGATIVAS | TOTAL      |
|----------|---|--|-----------|------------|
| KÍRARE   | 11 (14 %)   | 0  | 70 (86 %) | 81 (100 %) |

**TABLA 5.** Resultados de *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Kírare del Lote 1.



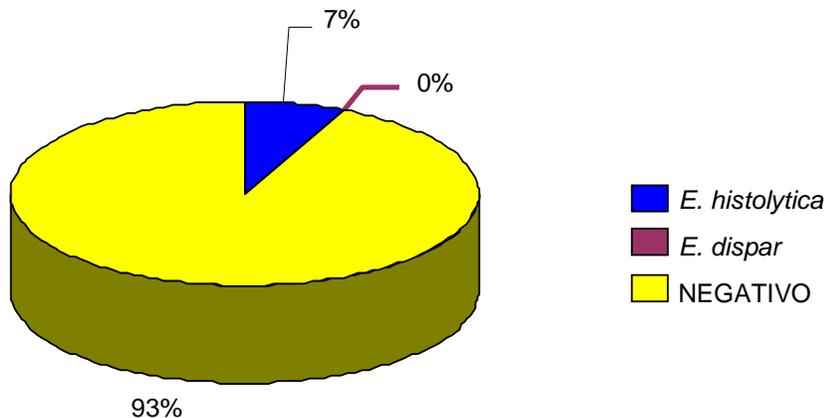
**GRAFICO 2.** Resultados de *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Kírare del Lote 1 representados en porcentajes.

De las 100 muestras que enviaron del albergue Sehuérachi, 7 muestras fueron positivas para *E. histolytica*, que corresponde a un 7 % (TABLA 6). No se obtuvieron muestras positivas para *E. dispar*. Observamos que la cantidad de muestras enviadas fue mayor del albergue Kírare aunque hubo un menor porcentaje de muestras positivas para *E. histolytica*. Los resultados también se muestran en el GRAFICA 3.

| ALBERGUE   | Número de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> | Número de muestras positivas para <i>E. dispar</i> | NEGATIVAS | TOTAL       |
|------------|---|--|-----------|-------------|
| SEHUERACHI | 7 (7 %)   | 0  | 93 (93 %) | 100 (100 %) |

**TABLA 6.** Resultados de *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Sehuérachi del Lote 1.

**Resultados albergue Sehuérachi Lote 1**

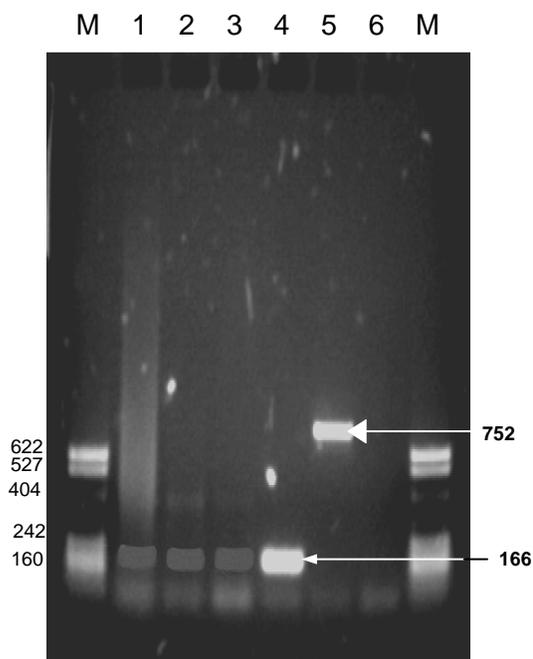


**GRAFICO 3.** Resultados de *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Sehuérachi del LOTE 1 representados en porcentajes.

**5.2 Resultados LOTE 2.**

De los resultados obtenidos del Lote 1 se realizó un reporte y se administró tratamiento antiparasitario que consistió en administración vía oral de nitazoxanida por 3 días y se realizó una segunda toma de muestras fecales. Para este segundo lote se enviaron un total de 18 muestras, las cuales fueron positivas a *E. histolytica*/*E. dispar* en los resultados del primer lote (LOTE 1).

De las 18 muestras positivas a *E. histolytica*, el albergue Sehuérachi envió 11 y el albergue Kírare envió 7.



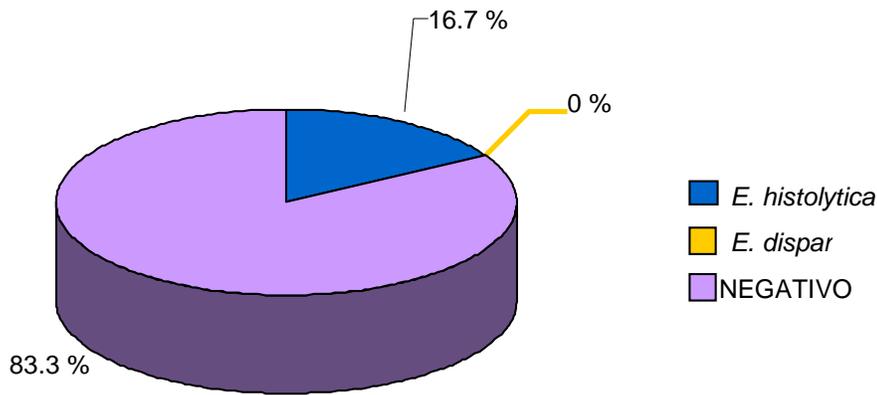
**Figura 9.** Resultados de las Muestras: 1) muestra 5, 2) muestra 9, 3) muestra 301, 4) Control positivo *E. histolytica*, 5) control positivo *E. dispar*, 6) control negativo (Agua)

En la figura 9 se muestra el gel donde se analizaron los productos de la PCR de los pacientes que resultaron positivos para *E. histolytica* en el Lote 2 (segundo envío).

En relación con el lote 1, en el lote 2 se presentaron mayores porcentajes de muestras positivas para *E. histolytica*, 11.1 % (2 muestras) para Kírare y 5.6 % (1 muestra) para Sehuérachi. El porcentaje total para considerando a ambos albergues fue 16.7 % de muestras positivas para *E. histolytica* y nuevamente no se obtuvieron resultados positivos para *E. dispar*.

| ALBERGUE   | Número de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> | Número de muestras positivas para <i>E. dispar</i> | NEGATIVAS   | TOTAL     |
|------------|---|--|-------------|-----------|
| KÍRARE     | 2 (11.1 %)  | 0  | 9 (50.0 %)  | 11        |
| SEHUERACHI | 1 (5.6 %)   | 0  | 6 (33.3 %)  | 7         |
| Total      | 3 (16.7 %)  | 0 (0 %)  | 15 (83.3 %) | 18 (100%) |

**TABLA 7.-** Resultados totales para el Lote 2, tampoco se presentaron resultados positivos para *E. dispar*.

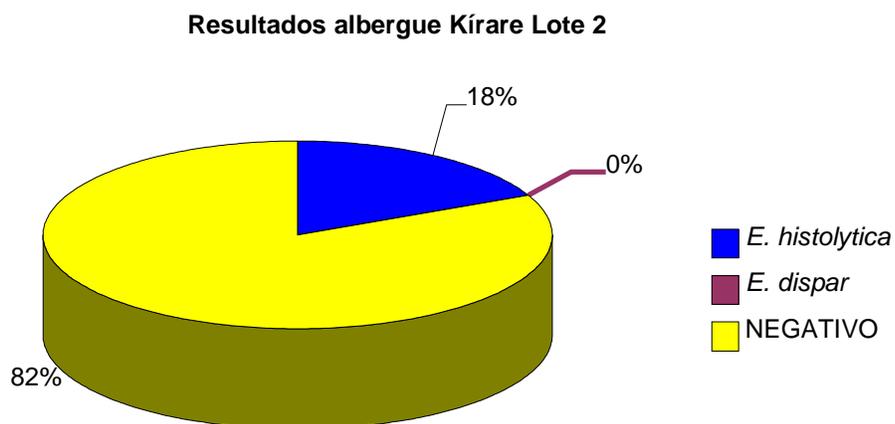


**GRAFICO 4.** Resultados de *E. histolytica*/*E. dispar* globales para el LOTE 2

Se obtuvieron 2 muestras positivas por *E. histolytica* para el albergue Kírare (TABLA 8). El porcentaje de este albergue para muestras positivas para *E. histolytica* fue de 18 % (solo considerando los resultados de este albergue) un porcentaje mayor que el obtenido en el Lote 1.

| ALBERGUE | Numero de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> | Numero de muestras positivas para <i>E. dispar</i> | NEGATIVO | TOTAL      |
|----------|---|--|----------|------------|
| KÍRARE   | 2 (18 %)  | 0  | 9 (82 %) | 11 (100 %) |

**TABLA 8.** Resultados del Lote 2 para *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Kírare

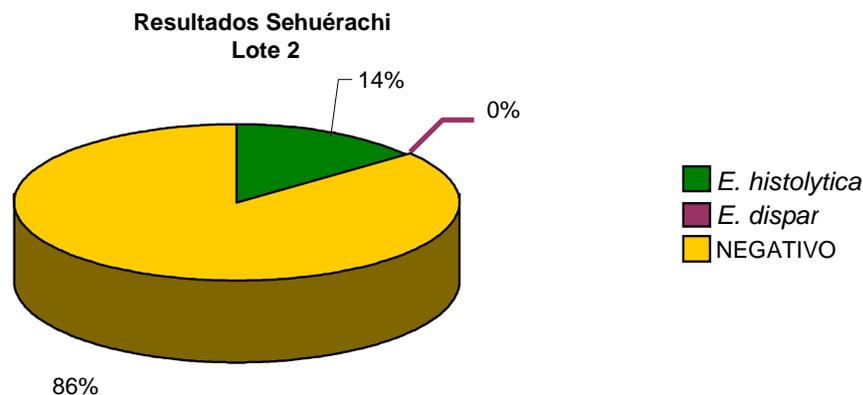


**GRAFICO 5.** Porcentaje de los Resultados para *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Kírare correspondientes al Lote 2.

En la TABLA 9 se muestran los resultados correspondientes a albergue Sehuérachi, donde solo hubo 1 muestra positiva por *E. histolytica* lo que representa el 14 % de un total de 7 muestras enviadas. Aunque solo es una muestra positiva para *E. histolytica*, representa un porcentaje mayor al que se tuvo en el Lote 1.

| ALBERGUE   | Número de muestras positivas para <i>E. histolytica</i> | Número de muestras positivas para <i>E. dispar</i> | NEGATIVAS | TOTAL    |
|------------|---|--|-----------|----------|
| SEHUERACHI | 1 (14%)   | 0  | 6 (86%)   | 7 (100%) |

**TABLA 9.** Resultados del Lote 2 para *E. histolytica*/*E. dispar* para el albergue Sehuérachi.



**GRAFICO 6.** Resultados para *E. histolytica*/*E. dispar* del albergue Sehuérachi correspondientes al Lote 2, representados en porcentajes.

En la Tabla 10 se muestra la prevalencia inicial y final de *E. histolytica* y *E. dispar* para la población infantil de los albergues Sehuérachi y Kírare. Solo se consideró el número total de la población infantil, ya que se desconoce el número total exacto de habitantes de ambas poblaciones ya que los desplazamientos hacen que este número fluctúe continuamente.

| Indicador                       | Prevalencia de Niños en % (casos/n) |                |                  |               |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------|---------------|
|                                 | <i>E. histolytica</i>               |                | <i>E. dispar</i> |               |
|                                 | Kírare                              | Sehuérachi     | Kírare           | Sehuérachi    |
| Prevalencia inicial<br>(LOTE 1) | 14 %<br>(11/81)                     | 7 %<br>(7/100) | 0 %<br>(0/81)    | 0%<br>(0/100) |
| Prevalencia final<br>(LOTE 2)   | 18 %<br>(2/11)                      | 14 %<br>(1/7)  | 0%<br>0/11       | 0%<br>0/7     |

**TABLA 10.** Comparación en base a la prevalencia infantil inicial y la prevalencia infantil final el para *E. histolytica* y *E. dispar* entre los niños de los albergue Kírare y Sehuérachi entre los meses Diciembre y Enero.

## 6. DISCUSIÓN

Los albergues Kírare y Sehuérachi se encuentran en condiciones de hacinamiento y pobreza que propician la propagación de enfermedades gastrointestinales, además los hogares donde pasan el resto del año también se encuentran en condiciones muy adversas, con la falta de servicios como: agua, drenaje, alimentación adecuada, medicamentos, que en conjunto acentúan esta situación. Esta investigación forma parte de un proyecto para mejorar las condiciones de vida de los habitantes de estas zonas marginales, contribuyendo en la detección de *E. histolytica*, agente causal de la amibiasis, para un posterior tratamiento farmacológico adecuado.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran una amplia diferencia entre los resultados positivos por microscopía (sensibilidad <60% y especificidad de 10 – 50%) y los obtenidos por PCR (sensibilidad de >90% y especificidad de 85%)<sup>12</sup>. A fin de comparar nuestros resultados hemos encontrado algunas investigaciones representativas realizadas en México en poblaciones rurales, y por supuesto, el papel que juegan en el subdiagnóstico los factores ambientales, son muy importantes.

Uno de los primeros casos de amibiasis en el que se usó la técnica de la PCR fue en 1992, en el Hospital General de México de la Ciudad de México. De 49 muestras analizadas, 60 % de estos casos de disentería eran debidos probablemente a *E. histolytica*. Los cebadores empleados fueron EHP1 y EHNP2 específicos para *E. histolytica* patogénica y no patogénica (*E. dispar*) respectivamente<sup>48</sup>. Desde entonces se usa la técnica de la PCR como una herramienta útil en la determinación y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en los laboratorios de investigación en México, aunque los cebadores empleados han sido tan diferentes como el avance en el descubrimiento de genes que codifican para estructuras moleculares características de cada especie.

Los cebadores utilizados en nuestra investigación son más específicos y no requirieron de un paso adicional que empleara enzimas de restricción o una nueva amplificación.

En otro estudio en una comunidad del estado de Morelos (Ramos *et al*<sup>52</sup>) reportaron en el 2005. De 903 muestras obtenidas, por microscopía la prevalencia del complejo *E. histolytica/E. dispar* fue de 12.8 %. Sin embargo, la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* detectado por PCR para esta comunidad fue de 13% para *E. histolytica* y 9.7% para *E. dispar*. En esta comunidad fueron notorias las condiciones de hacinamiento y baja calidad del agua potable lo que incrementa el riesgo de contagio<sup>52</sup>.

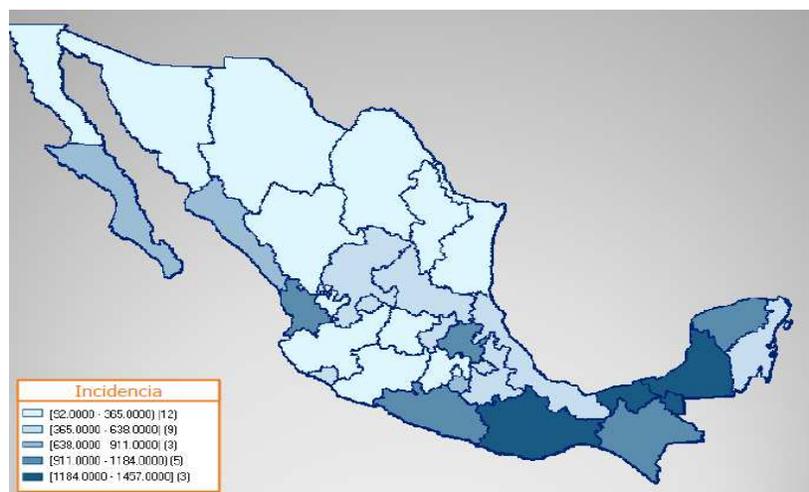
Otro estudio realizado también en el estado de Morelos por Ramos F. *et al*.<sup>53</sup> mediante la técnica de PCR, *E. histolytica* fue detectada en 33 de 290 muestras de heces (11.4%), mientras que *E. dispar* fue detectada en 21 muestras (11.4%) y ambas especies en 7 muestras (2.4%).

En 1993 por Acuña-Soto *et al*<sup>54</sup>, en el estado de Chiapas, México, evaluaron 201 muestras escogidas aleatoriamente, de las cuales 12 % (25 muestras) fueron positivas por microscopía para *E. histolytica/E. dispar*. De las 25 muestras positivas, 24 fueron positivas por PCR. Aparte se analizaron las otras 176 muestras por PCR de las cuales 3 fueron positivas. El análisis de los resultados de PCR mostró tres grupos: el primero con 14 muestras (51.85%) con infección mixta (*E. histolytica/E. dispar*); un segundo grupo con 9 muestras positivas (33.33%) para *E. histolytica*; y un tercer grupo, con 1 muestra positiva (3.70%) para *E. dispar*. Estos resultados muestran que hay mayor prevalencia de infecciones por *E. histolytica* que para *E. dispar*, esto tiene como consecuencia que el tratamiento sea eficaz y no se aplique indiscriminadamente.

Estos ejemplos particulares de cuatro estudios realizados nos dan un panorama de los índices más comunes observados en poblaciones endémicas de la República Mexicana que, a diferencia de otros países, son más comunes porcentajes más elevados de *E. histolytica* que de *E. dispar*. Comparando con un estudio realizado por Hooshyar H. *et al* (2004)<sup>55</sup> en Irán de 226 muestras positivas para *E. histolytica/E. dispar* por microscopía, 92.1 % fueron positivas para *E. dispar* y el restante para *E. histolytica* y para infecciones mixtas por el método de PCR-RFLP.

Las ventajas de la PCR son una sensibilidad y especificidad (>90% y 85%) mucho mayores a los de la microscopía (<60% y 10 – 50%)<sup>12</sup>. Estos porcentajes de sensibilidad y especificidad de la microscopía pueden resultar en falsos positivos o falsos negativos.

*E. histolytica* representa un problema de salud mayor en zonas tropicales y templadas que en zonas montañosas y desérticas como lo es el caso de los albergues donde se realizó el estudio. El albergue Sehuérachi está situado a una altitud de 2140 metros y el albergue Kírare a 2020 metros sobre el nivel del mar<sup>58</sup>, ambos se localizan al sur del estado de Chihuahua. La mayoría de los reportes que se realizan en su mayoría en zona subtropicales del mundo como es el caso de Bangladesh y en el caso de México, en la región de Morelos. El quiste no sobrevive en temperaturas extremas menores a -5° C y mayores a 40° C<sup>12</sup>, y en la sierra tarahumara, específicamente en el lugar donde se localizan los albergues, las temperaturas mas comunes oscilan entre los -18.5° C y los 45° C. Una razón que justifica el bajo porcentaje de pacientes positivos para *E. histolytica* /*E. dispar*. en la figura 10 se muestra un mapa de la República Mexicana con la distribución por estados del grado de incidencia por cada 100 000 habitantes de amibiasis. Se observa que el estado de Chihuahua posee un grado bajo de incidencia (casos nuevos en un periodo de tiempo) en comparación con otros estados como Tabasco<sup>63</sup>.



**FIGURA 10.** Incidencia de amibiasis intestinal en la República Mexicana. Fuente: SUIVE/DGAE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos-2008<sup>63</sup>

La amibiasis no es un problema de salud tan importante en el estado de Chihuahua como lo es para el estado de Morelos. En el informe de la Secretaría de Salud del 2008, la amibiasis figura en el lugar 12 en el estado de Chihuahua<sup>63</sup>, a diferencia del 5 puesto que ocupa a nivel nacional<sup>1</sup>. Este comparativo explica en parte el bajo porcentaje de casos positivos para *E. histolytica* hallados en la investigación.

Considerando la enorme diferencia entre los resultados obtenidos mediante microscopía en el LOTE 1 (100 % positivas para microscopia), y los obtenidos por el análisis de PCR (18 muestras del total), se puede notar los problemas para identificar adecuadamente los quistes de *E. histolytica* / *E. dispar*, ya que solo tenemos un pequeño porcentaje de pacientes positivos (9.94%) y de estos solo hubo pacientes positivos para *E. histolytica*. Además, como indican los reportes de C. Ximénez *et al* y Ramos *et al*<sup>48,52, 53</sup>, en la población mexicana es más común encontrar *E. histolytica* que *E. dispar* a diferencia de otras regiones del mundo, así mismo la virulencia de estas cepas de *E. histolytica* es menor, teniendo en cuenta los casos de colitis amibiana y absceso hepático de México en comparación con otros países como Bangladesh o Brasil.

El clima que predomina en la Sierra Tarahumara, ya comentado, explica en parte los bajos porcentajes de *E. histolytica* (9.94 % en total) encontrados en esta muestra poblacional y el hecho de no encontrar *E. dispar*. Haciendo el comparativo con los resultados obtenidos por microscopía, se puede evaluar tanto la sensibilidad como la especificidad mayor alcanzada con el ensayo por PCR.

En el Lote 2, enviado después de realizar un tratamiento antiparasitario, las muestras fueron considerablemente menos (18 muestras por ambos albergues), el porcentaje fue de 16.7% (3 muestras positivas totales), porcentaje cercano a los porcentajes reportados en la mayor parte de los artículos mencionados.

Otros parásitos encontrados en el análisis microscópico fueron *Giardia lamblia* y *Ascaris lumbricoides*, sin embargo no se notificaron porcentajes específicos de estos parásitos o de otros encontrados en el análisis microscópico realizado por el personal que envió las muestras a la Unidad de Medicina

Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM ubicado dentro del Hospital General de la Ciudad de México.

El diagnóstico de *E. histolytica* es necesario desde la perspectiva de que *E. dispar* es una especie no patógena. Actualmente el diagnóstico por microscopia ofrece una baja especificidad y sensibilidad (<60 %). Tanto el cultivo como el análisis por isoenzimas son más sensibles y específicos además pueden diferenciar las tres especies, sin embargo, ambos son muy tardados en tiempos de proceso. Por esta razón, las metodologías que usan biología molecular se están implementando cada vez más en el diagnóstico de estas dos especies morfológicamente iguales para diferenciar la especie patógena de la no patógena.

Las prevalencias finales fueron mayores a las iniciales (en el albergue Kírare la prevalencia inicial fue de 14 % y la prevalencia final de 18 % y en el albergue Sehuérachi la prevalencia inicial fue de 7% y la final de 14%) lo que indica una reinfección que se está presentando en el lugar de origen de los niños, ya que pasan únicamente 2 meses en los albergues. La falta de una desparasitación de familias completas además de las condiciones de hacinamiento y la falta de higiene propician los casos de reinfección, que justifican los porcentajes de prevalencia más altos en el Lote 2 posterior al tratamiento.

## 7. CONCLUSIÓN

Los porcentajes de resultados positivos para *E. histolytica* fueron bajos en la población analizada (9.94 % antes del tratamiento y 16.7 % después del tratamiento). Así como se demostró una mayor sensibilidad y especificidad del la técnica de PCR en comparación con la microscopía. La prevalencia de *E. dispar* fue nula, probablemente debido al clima árido de la región y a las temperaturas extremas, comportamiento que se acentúa en climas como el de la Sierra Tarahumara. Si comparamos nuestros resultados con la prevalencia reportada en otros estudios realizados en zonas tropicales y subtropicales muestran un porcentaje mayor.

La extracción del DNA llevada a cabo mediante el Kit comercial empleado (***QIAamp stool DNA extraction kit***) fue adecuada para el PCR llevado a cabo ya que se encontró DNA en el total de muestras analizadas al realizarse la electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % en cada una de ellas.

La amplificación de los fragmentos de DNA fue adecuada ya que en los geles que se analizaron, los controles fueron visibles tanto para *E. histolytica* como para *E. dispar*.

El análisis llevado a cabo en los geles de agarosa nos permitió determinar las muestras positivas y la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en nuestra muestra poblacional.

En el lote 2 se presentaron muestras positivas a pesar del tratamiento dado a la población de dichos albergues, esto probablemente debido a que no tomaron el tratamiento adecuadamente o bien a una reinfección del paciente. Y como pudo observarse, los porcentajes fueron mayores a pesar de enviar un número menor de muestras. Finalmente se logró disminuir el número de total casos de casos positivos a *E. histolytica*.

El diagnóstico por metodologías basadas en Biología Molecular, como la PCR, ofrecen sensibilidades y especificidades mayores que metodologías serológicas o microscópicas. En otras palabras, la PCR permite que con una

cantidad muy pequeña de muestra se pueda realizar el diagnóstico específico del agente causal que se esté investigando.

Debido a las carencias de los albergues donde se tomaron las muestras (Kírare y Sehuérachi), el análisis por microscopía solo se realizó con una sola toma lo cual agrega un mayor margen de error al que tiene esta metodología, sin embargo los resultados obtenidos por PCR están acordes con los bajos índices reportados por la Secretaría de Salud para el estado de Chihuahua.

Los costes que resultan de implementar las metodologías basadas en Biología Molecular son muy elevados. Resulta más conveniente en las instituciones de salud realizar el examen microscópico y si se diagnostica *E. histolytica/E. dispar*, dar tratamiento antiparasitario. Esto a largo plazo resulta peligroso ya que se está demostrando que el complejo *E. histolytica/E. dispar* está desarrollando resistencia a los fármacos de amplio espectro, como el metronidazol.

La perspectiva es implementar la metodología por PCR para evitar el subdiagnóstico y que a largo plazo se necesite desarrollar fármacos más específicos y potentes.

## 8.- REFERENCIAS

1. Dirección General de Epidemiología; Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad; 2003.
2. Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980;152:377 –90.
3. Diamond LS. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 1961; 134: 336-7.
4. Sargeant PG, Williams J.E, Grene J.D. The differentiation of invasive and non invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-21
5. World Health Organization. Amoebiasis. Report on the WHO/Pan American Health Organization/UNESCO Expert Consultation, Mexico City. *Wkly Epidemiol Rec* 72, 1997: 97-100.
6. Walderich, B., A. Weber, And J. Knobloch. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic regions. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 1997. 57:7074
7. Romero Cabello Raúl (coordinación académica y editorial) Amibiasis en el siglo XXI. 1ª Edición. *Sociedad Mexicana de Parasitología, A. C.* p.p. 39 – 43, 64 – 65.
8. Hughes MA & Petri WA Jr. Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 565-582.

9. Mehmet Tanyuksel and William Petri, Jr. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* Oct 2003: 713:729.
10. Reeves RE. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudin. *Adv Parasitol* 1984. 105 – 42.
11. Clark, C. G., M. Espinosa C. and A. Bhattacharya. *Entamoeba histolytica*: an overview of the biology of the organism, p. 1-45. In J.I. Ravdin (ed), Amebiasis, 2000. Imperial College Press, London, UK.
12. Stanley L. Samuel Jr. Amoebiasis (Seminar). *The Lancet Vol 361, 2003.* 1025 - 1034
13. Ravdin JI, Guerrant RL. Role of adherence in cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* 1981;68:1305 –13.
14. Leippe, M. Amoebapores. *Parasitol. Today* 13, 1997. 178–183
15. Long-Krug, S.A. *et al.* Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.*1985. 152, 536–541
16. Eckmann, L. *et al.* *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 $\alpha$ . *J. Clin. Invest* 1995. 96, 1269–1279
17. Bruchhaus I. Jacobs T. Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: differences in numbers and expression of cystein proteinase genes. *Mol Microbiol* 1996, 22: 255 – 263.

18. Stanley L. Samuel Jr. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology* Vol 17 No. 6; 280-285.
19. Stanley SL, Zhang T, Rubin D, Rubin D, Li E. Rol of the *Entamoeba histolytica* cystein proteinasa in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect immune* 1995, 63. 1587 – 1590.
20. Gilchrist Carol A, Petri William Jr. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Current Opinion in Microbiology* 1999, 2: 433-437.
21. R. Fotedar *et al.* Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007. 511 – 532.
22. Leippe, M. *et al.* Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* 1992 11, 3501-3506
23. Leippe, M. *et al.* Amebapores, a famiIy of membranolytic peptides from cytoplasmatic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmatic membranes. *Mol. Microbiol.* 1994 14, 895-904
24. Leippe, M. *et al.* Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 2602-2606.
25. Rodriguez MA, Hidalgo ME, Sanchez T, Orozco E: Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase gene. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 78: 273-277.

26. Mukhopadhyay C, Lohia A: Modeling of *Entamoeba histolytica* ferredoxin. *J Biomol Struct Dyn* 1998, 15: 663-672.
27. Haque R. *et al.* *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J. Infect Dis* 1997. 175:734-736.
28. Bracha R, Mirelman D: Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. *J Exp Méd* 1984, 160:353-368.
29. Verdón R. *et al.* A model of interaction between *Entamoeba histolytica* and *Shigella flexneri*. *Res Microbiol* 1992, 143:67-74.
30. Tannich, E., and G. D. Burchard. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:250-255.
31. Clark, C.G., *et al.* Unique organization of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006; 146: 24-29.
32. Ali, IKM. *et al.*, Molecular epidemiology of amebiasis, *Infect. Genet. Evol.* (2008). doi:10.1016/j.meegid.2008.05.004
33. Huston, C. D., R. Haque, and W. A. Petri, Jr. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert Rev. Mol. Med.* 1999; 22:1-11.
34. Clark, C.G. and L.S. Diamond. Methods for cultivation of luminal parasitic protest of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15:329-341.

35. Diamond, L.S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 1961; 134:336-337.
36. Sargeant, P.G. *et al.* The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. *Arch. Investig. Med.* 1987; 18:69-75.
37. Blanc, D.R, Nicholls, P, and G. Sargeant. Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1989; 83:787-790.
38. Gonzalez-Ruiz, A., R. Haque, A. Aguirre, G. Castanon, A. Hall, F. Guhl, G. Ruiz-Palacios, M. A. Miles, and D. C. Warhurst. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47:236-239.
39. Zengzhu, G., R. Bracha, Y. Nuchamowitz, W. Cheng, and D. Mirelman. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 37; 1999; 3034-3036.
40. Goncalves, M. L., V. L. da Silva, C. M. de Andrade, K. Reinhard, G. C. da Rocha, M. Le Bailly, F. Bouchet, L. F. Ferreira, and A. Araujo. Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004; 98:88-91.
41. Hung, C. C., *et al.* Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infections. *AIDS* 13: 1999; 2421-2428.

42. Liu, C. J., *et al.* Amebic liver abscess and human immunodeficiency virus infection: a report of three cases. *J. Clin. Gastroenterol.* 2001; 33:64-68.
43. Haque, R., K. Kress, S. Wood, T. F. G. H. Jackson, D. Lyerly, T. Wilkins, and W. A. Petri, Jr. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose specific adhesin. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:247–249
44. Mirelman, D., Y. Nuchamowitz, and T. Stolarsky. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:2405–2407.
45. Haque, R., I. K. Ali, S. Akther, and W. A. Petri, Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.* . 1998; 36:449–452.
46. Haque, R., L. M. Neville, P. Hahn, and W. A. Petri, Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2558–2561.
47. Zuhainan Hamzah *et al.* Differential Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a Single-Round PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006. 3196 – 3200.
48. Ximenez Cecilia. Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A molecular Approach. *Arch of Med Research* 2006, 37:263-265.

49. Troll, H., H. Marti, and N. Weiss. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1997;1701–1705.
50. Edman, *et al.* 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 172: 879–888.
51. Blessmann J, *et al.* Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4413-7.
52. Ramos F, *et al.* High Prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:83-91.
53. Ramos F, *et al.* *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Prevalence infection in a rural Mexican community. *Exp Parasit* 2005;110:327-330.
54. Acuña.Soto R, *et al.* Application of the Polymerase Chain Reaction to the Epidemiology of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:58-70.
55. Hooshyar H,*et al.* The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central, and southern Iran. *Parasitol Res.* 2004 Sep;94(2):96-100.
56. Loftus B, *et al.*:The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 2005, 433:865-868.

57. Caballero-Salcedo, A., M. Viveros-Rogel, B. Salvatierra, R. Tapia-Conyer, J. Sepulveda-Amor, G. Gutierrez, and L. Ortiz-Ortiz. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, 50:412–419
58. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/conteo2005/localidad/iter/default.asp?s=est&c=10395>
59. <http://mexico.pueblosamerica.com/fotos-satelitales/sehuerachi>
60. Margulis Lynn, H.I.M.e.a.L.E., *Illustrated Glossary of Protoctista* Jones and Bartlett publishers,, 1992: p. 34-40.
61. Rossignol, Jean-Francois *et al*, Nitazoxanide in the treatment of amoebiasis. *Royal Society of Tropical Medicine and Higiene* 2007: 101:1025—1031.
62. Margulis Lynn, H.I.M.e.a.L.E., *Illustrated Glossary of Protoctista* Jones and Bartlett publishers,, 1992: p. 34-40.
63. Boletín SUIVE/DGAE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos-2008

## APENDICE

### **Mezcla de reacción**

- Desoxiribonucleosidos trifosfatados (dNTP)
- Cebadores
- MgCl<sub>2</sub>
- Taq Polimerasa
- Taq Buffer.
- 10 µl de muestra de DNA extraído de cada muestra de los pacientes.

### **Preparación de TAE 50X (solución amortiguadora para corrimiento electroforético y preparación de Agarosa al 1 %)**

- Tris base 242 g
- Acido acético 57.1 g
- EDTA 100 ml

Ajustar a pH 8.0 con acido acético glacial.

### **Preparación de AGAROSA al 1 %**

- Pesar 3 g de agarosa al 100 %
- Diluir los 3 g en un volumen final de 300 mL de solución TAE a 1X

### **Reactivos del kit de extracción de material genético *QIAamp stool DNA extraction kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania)**

Buffer AL.

Proteinasa K

Buffer AW1

Buffer AW2

Tableta InhibitEX