



11262
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SUBDIVISION DE MAESTRIAS Y DOCTORADOS

"ANTIGENOS HLA ASOCIADOS AL ESTADO
DE PORTADOR ASINTOMATICO DE
Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar,
EN MESTIZOS MEXICANOS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :

EDITH VALDEZ MARTINEZ



TUTORES
DR. MA. DEL CARMEN MARTINEZ GARCIA DR. ALEJANDRO GOMEZ DELGADO

MEXICO, D. F.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	Páginas
I. Resumen	1
II. Antecedentes	3
III. Justificación	21
IV. Planteamiento del problema	22
V. Hipótesis	23
VI. Objetivos	24
VII. Sujetos, material y métodos	25
VIII. Resultados	41
IX. Discusión	46
X. Conclusiones	57
XI. Bibliografía	59
XII. Cuadros y figuras	71

I. RESUMEN

Objetivo: Determinar el grado de asociación entre los antígenos HLA-A, B, DR, y complotipos con el estado de portador asintomático de *Entamoeba histolytica* / *E. dispar*

Sujetos, material y métodos

Diseño de la investigación: Casos y controles (52 y 53 respectivamente), seleccionados a partir de una cohorte de 2,599 mestizos mexicanos mayores de 18 años de edad, que acudían a consulta por sintomatología diferente a la gastrointestinal a las Unidades de Atención Primaria a la Salud del I.M.S.S. en el Valle de México

Al término de 12 meses de seguimiento, las personas con uno o más coproparasitoscópicos o cultivo de Robinson positivos a *E. histolytica*/*E. dispar* fueron consideradas como casos; los individuos con el 100% de muestras negativas formaron el grupo control.

Cada mes se aplicaron cuestionarios para obtener información de las características sociodemográficas, hábitos higiénicos y estado clínico. En cada ocasión se efectuó la recolección de una muestra de heces. Al inicio y cada seis meses se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de anticuerpos IgA e IgG, y mensualmente muestras de saliva para la cuantificación de IgA. Al completar un año de seguimiento se realizó la tipificación serológica de los antígenos HLA Clase I, II y la determinación de complotipos.

Resultados y discusión

El 47% de las muestras de los portadores fueron positivas al protozooario, mientras que el 99.8% de los controles se mantuvo negativo a todo tipo de parásitos a lo largo del seguimiento. No se presentó evidencia de enfermedad amibiana en ninguno de los sujetos de estudio. Al 50% de los casos se les identificó el tipo de especie, por PCR, y todos ellos mostraron *E. dispar*. La falta de agua potable intradomiciliaria y la ausencia del hábito de lavado de manos después de ir al baño fueron las variables identificadas como factores de riesgo para la adquisición del estado de portador (OR=3.80, I.C. 95% 1.15-12.56, p=0.03; y OR=4.30, I.C. 95% 1.12-16.62, p=0.03 respectivamente), hallazgos que resultan además de coherentes con la forma de transmisión de la infección amibiana, consistentes con lo reportado para la adquisición de otras infecciones de transmisión vía fecal-oral.

El grupo de portadores difirió del de controles por poseer títulos mayores de anticuerpos IgG e IgA secretora anti-*E. histolytica*, si bien, estos resultados no nos permiten diferenciar entre el tipo de especie infectante, son de utilidad para distinguir a los portadores del parásito

No hubo asociaciones primarias o secundarias a desequilibrio de enlace con ninguno de los antígenos HLA y complotipos, empero, con las cifras observadas y el gran polimorfismo de B35 y DR4 convendría realizar estudios moleculares que descarten posibles diferencias en los subtipos de estos antígenos entre ambos grupos.

Aunque nuestros resultados parecen señalar a los hábitos y costumbres como responsables de las diferencias en la infección por el protozoario, todavía no podemos descartar en forma concluyente la no participación del complejo principal de histocompatibilidad.

II. ANTECEDENTES

CONCEPTOS Y CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS:

El término amibiasis se usa para describir tanto la infección como la enfermedad causadas por *E. histolytica*/*E. dispar** a la enfermedad se le denomina amibiasis invasora para distinguirla de la infección, la cual se conoce también como amibiasis luminal o estado de portador asintomático¹. La amibiasis luminal constituye aproximadamente el 90% de las diferentes formas de presentación de amibiasis¹ y se caracteriza por la presencia del parásito en la luz del intestino sin causar lesiones ni síntomas³. Operativamente, el estado de portador asintomático fue definido a través de la presencia de quistes del protozoario en exámenes coproparasitológicos de individuos asintomáticos, sin evidencia de lesiones identificables en estudios radiológicos (colon por enema) y mediante sigmoidoscopia, así como reacciones serológicas negativas⁴.

La parasitosis por *E. histolytica* tiene distribución universal, afecta en promedio al 10% de la población mundial², esto es, existen alrededor de 500 millones de personas infectadas, de las cuales, 40 millones (8% a 10%) sufren amibiasis invasora². Actualmente se considera que la mayoría de los llamados portadores asintomáticos de *E. histolytica* en realidad podrían estar infectados por *E. dispar*.

En relación a la mortalidad, la amibiasis invasora es la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias después de la Malaria y la Esquistosomiasis², con una cifra estimada de 75 000 defunciones por año².

**Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, término utilizado para hacer referencia a lo que anteriormente, ante la ausencia de identificación del tipo de especie infectante, se consideraba una población homogénea de *Entamoeba histolytica*.

En México no se conoce con precisión la magnitud de la infección y la morbimortalidad causadas por *E. histolytica*. La frecuencia de la infección amibiana se ha intentado medir a través de la identificación de quistes de heces, reportándose variaciones del 0% al 55%⁵⁻¹⁰, estas variaciones se han relacionado con la utilización de distintas técnicas coproparasitológicas, diferente capacitación técnica entre observadores y con sesgos de selección en las poblaciones estudiadas. A pesar de estas diferencias se ha estimado que la prevalencia de portadores, a nivel nacional, es del 10 al 20%¹¹. De igual manera, se calcula que para 1987 se presentaron 1 200 000 casos de disentería, y cerca de 10 000 casos de absceso hepático amibiano¹². Recientemente, un estudio ecológico¹³ de tendencias, nacional, que comprende a los años de 1986 a 1994, muestra una tendencia estable de amibiasis en todas sus formas clínicas de presentación, así como en su manifestación extraintestinal a nivel hepático, y aun cuando el trabajo tiene limitaciones metodológicas propias del diseño del estudio, la tasa estable (4×10^5) observada en el diagnóstico de absceso hepático amibiano puede ser más representativa de la verdadera frecuencia de la enfermedad. Por consiguiente se puede afirmar que en la última década no se ha logrado un descenso significativo en la presentación de absceso hepático amibiano, pero sí de la letalidad, esto último como efecto secundario a las acciones de los servicios de atención médica. Aún así, la amibiasis continua siendo un problema importante de salud pública en nuestro país¹³.

CONDICIONES AMBIENTALES:

Dentro de las causas que contribuyen al desarrollo de la infección del tubo digestivo por protozoos y helmintos, están las condiciones ambientales en que vive el huésped, específicamente los servicios de saneamiento (manejo de excretas y disponibilidad de agua potable);¹⁴⁻¹⁷ sin embargo, no se pueden calificar de concluyentes tales asociaciones ante las limitantes metodológicas (sesgo de confusión e inadecuado registro de datos) de los trabajos publicados al respecto¹⁵. No obstante, en algunos estudios se identifica a la dinámica de la infección por parásitos intestinales como un proceso multifactorial, donde además de la infraestructura de los servicios se destacan las condiciones socioeconómicas y la educación^{14, 15, 17-19}. Este último factor probablemente sea el más importante, porque hace la diferencia entre utilizar adecuadamente o no los servicios de que se dispone, y especialmente porque establece la situación intradomiciliaria que favorece las condiciones de transmisión^{14, 15, 18}. Otra interesante observación radica en la disimilitud de la seroprevalencia en estados con diferentes condiciones climáticas^{19, 20} lo cual indica que la frecuencia de amibiasis no está directamente relacionada con el clima, por ejemplo, en Tamaulipas donde prevalece el clima tropical, se reportan frecuencias bajas (2.37%); mientras que la ciudad de México, la cual tiene un clima no tropical, muestra una seropositividad del 8.82%¹⁹.

CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE:

Durante la última década la mayor parte del esfuerzo se ha enfocado al estudio del protozooario, culminando con uno de los logros más importantes en el campo de la amibiasis (enero 1997) la confirmación de dos especies distintas de *Entamoeba*¹, una altamente virulenta (*E. histolytica*) y otra saprófita (*E. dispar*), ambas difieren en su habilidad para causar enfermedad en humanos así como por varios criterios bioquímicos y moleculares. Las cepas clasificadas como patógenas se caracterizan por a) aglutinar en presencia de concanavalina A²¹; b) fagocitar eritrocitos²²; c) producir abscesos hepáticos amibianos en el modelo del hámster⁴; d) constituir grupos de zimodemos particulares²³⁻²⁴, y e) poseer características moleculares asociadas a su patogenicidad²⁵⁻²⁸.

El término zimodemo (zymos = enzima, demos = población) corresponde a una población de amibas que difiere de poblaciones similares respecto al patrón electroforético de cuatro enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos: glucosa fosfato isomerasa (GPI), L-malato óxido reductasa (ME), fosfoglucomutasa (PGM) y la hexoquinasa (HK)²⁴.

Hasta el momento, se han podido identificar 22 zimodemos²⁴⁻²⁶ los cuales permiten clasificar a las amibas en patógenas y no patógenas. La patogenicidad es definida por la ausencia de una banda alfa y la presencia de una banda beta en el corrimiento electroforético de la PGM y bandas de corrimiento rápido de la HK, excepto en el zimodemo XIII²³⁻³⁰.

Sargeant en 1978²³, usó este método para clasificar a las amibas en patógenas y no patógenas, esto como resultado del análisis de zimodemos de miles de aislamientos clínicos. Recientemente se ha aceptado mediante consenso de expertos¹ que el patrón de zimodemos es una característica fenotípica estable de una especie dada.

Se dispone ahora de métodos de laboratorio con mayor definición que los zimodemos, de entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, probablemente es el que ha tenido el mayor impacto en el avance reciente de la biología molecular. Esta técnica permite amplificar, a gran escala, regiones específicas del ADN. El principio del PCR se basa en el uso de oligonucleótidos sintéticos ("iniciadores") que son complementarios a secuencias que flanquean una región específica del ADN molde o "templado". Por medio de ciclos de amplificación repetidos, inducidos por cambios alternativos de temperatura que permiten el alineamiento de los "iniciadores" con las secuencias complementarias y la síntesis del fragmento de interés mediante el uso de una ADN polimerasa (la Taq polimerasa) es posible amplificar de manera casi exponencial fragmentos definidos de un ADN genómico³¹. Al respecto, Sammuelson y colaboradores en 1989³² describieron dos pares de sondas de DNAc, una hibridiza selectivamente a 145 pares de bases -solo para zimodemos patógenos- estas son, P1: TCAAAATGGTCGTCGCTAGGC (Tm=66°C) y P2: CAGTTAGAAATTATTGTAC-TTTGTA (Tm=62°C), mientras que las secuencias exclusivamente no patógenas, comprenden 133 pares de bases, y son, NP1: GGATCCTCCAAAAATAAAGTTT (Tm=60°C) y NP2: ATGATCCATAGGTTATAGCAAGACA (Tm=64°C). Con estos dos pares de sondas, Acuña-Soto y colaboradores³³ estudiaron 201 aislados de DNA de *Entamoeba* a partir de heces de sujetos residentes de una zona rural del estado de Chiapas. Las sondas utilizadas fueron capaces de distinguir entre *E. histolytica* y otras especies de amibas del intestino humano, cabe mencionar que los resultados del PCR al compararse con los de los coproparasitoscópicos, arrojaron un 96% de sensibilidad y un 98% de especificidad. En el mismo sentido apuntan los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos de 45 muestras de heces positivas a *E. histolytica/E. dispar* (por microscopía de luz), utilizando las mismas secuencias de

sondas pero marcadas radioactivamente, y comparadas con zimodemos (como estándar de oro)³⁴. Se han descrito otras sondas con buenos índices de sensibilidad y especificidad, aunque no se han probado en condiciones de campo como lo hicieron Acuña-Soto y colaboradores³³. Algunas de estas sondas son: a) la eEHP1 y la cEHP1³²; b) una clona de cDNA de 0.7 kb³⁵ y c) sondas de DNA P145 y B133³⁶.

CARACTERÍSTICAS DEL HUÉSPED:

Los atributos del hospedero asociados a ambiasis han sido descritos en la literatura sin tener un conocimiento preciso del mecanismo por medio del cual interactúan con el parásito³⁶. Cuando el estado de portador asintomático se analiza por grupos de edad, se observa que este es poco frecuente en menores de un año³⁷ y que se incrementa en forma progresiva a medida que avanza la edad^{7, 38}. Con relación al sexo, se reporta una similar distribución de frecuencias entre hombres y mujeres^{33, 38}. Por otro lado, la influencia del estado nutricional del hospedero ha sido aceptado más por reiteración que por demostración^{36, 39}. Otro de los factores de riesgo propuestos son los deficientes hábitos de higiene, prácticamente no existen estudios que evalúen sistemáticamente su participación en la transmisión del protozooario. Una manera indirecta de evaluar la repercusión de los hábitos higiénicos en la transmisión del parásito ha sido proponer que, debido a que se ha demostrado que las tasas de incidencia de diarrea infecciosa causadas por *Shigella* descienden entre 14 y 48% después de la mejoría en la higiene personal y doméstica⁴⁵; y en vista de que ambos microorganismos parecen compartir ciertas características epidemiológicas, el papel que los hábitos de higiene desempeñan en la transmisión de *E. histolytica*/*E. dispar* puede ser trascendente.

El ciclo de vida de la *E. histolytica* / *E. dispar* no requiere de una fase de invasión tisular, ya que el parásito es capaz de sobrevivir y reproducirse en la luz intestinal, y ser eliminado al exterior en forma de quiste⁴⁰ para reiniciar el ciclo con la ingestión de éste, por otro hospedero susceptible³⁶. Se sabe además, que la eliminación de quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* por un portador es intermitente, probablemente por la diferente velocidad de reproducción de las cepas, dieta, factores mecánicos/fisicoquímicos del tracto gastrointestinal y estado inmunológico del hospedero⁴¹. Aunque se han publicado pocos trabajos respecto a la duración del

estado infeccioso, se conoce que éste puede ser variable, con erradicación espontánea del parásito en la mayoría de los casos^{37, 42, 45}.

En la India⁴² se efectuó el seguimiento de 15 pacientes portadores de *E. histolytica/E. dispar* durante un promedio de nueve meses, en todos hubo eliminación espontánea del parásito sin manifestaciones de amebiasis invasora. A pesar del número de sujetos, de la ausencia de identificación de zimodemos y de lo inconsistente del seguimiento (1 a 18 meses) los autores concluyeron que un portador asintomático del parásito tiene pocas probabilidades de enfermar. Otro estudio -llevado a cabo en Durban, África-⁴⁴ reporta el seguimiento de 20 portadores de zimodemos patógenos, detectados a partir de una población de 1,824 individuos, identificando dos casos de amebiasis invasora a las dos semanas de iniciado el estudio, mientras que el resto de los sujetos eliminó el parásito sin tratamiento después de un año de observación. También se reportan los resultados de una cohorte de 99 sujetos integrantes del personal de la aerolínea alemana Lufthansa, el seguimiento clínico y parasitológico fue de dos años (la duración de la infección se desconoce), a cuatro de ellos se les identificó como portadores de zimodemos patógenos, de estos últimos sólo uno presentó evidencia de enfermedad intestinal en una ocasión a lo largo del seguimiento, los restantes 98 portadores cursaron asintomáticos⁴⁶. Más recientemente Ruiz-Palacios y colaboradores⁴⁵ publicaron su experiencia en una cohorte de 71 portadores asintomáticos de *E. histolytica/E. dispar* en la Ciudad de México, los cuales fueron seguidos durante 8 meses sin tratamiento, se determinó el zimodemo en el 27% de ellos, y sólo uno, en una ocasión, excretó quistes del parásito con zimodemo patógeno. Ninguno presentó evidencia clínica de enfermedad amebiana, además, los autores identificaron tres patrones de comportamiento respecto a la eliminación de quistes: **portadores crónicos persistentes**, con eliminación continua de parásitos (26%),

portadores intermitentes, con muestras positivas e intervalos sin eliminación del parásito (37.7%) y **portadores transitorios** (individuos con un solo coproparasitoscópico positivo (36.4%))

Es importante observar que en ninguno de los estudios anteriores se implementó una cohorte de comparación, de manera que pudieran ser identificados algunos factores de riesgo. Recientemente nuestro grupo observó la evolución de dos cohortes, madres portadoras y no portadoras del protozoo³⁷, los dos grupos pertenecían a estratos socioeconómicos semejantes y compartían las mismas condiciones del ambiente. En forma consistente, las madres del primer grupo se mantuvieron como portadoras de *E. histolytica/E. dispar* a lo largo de un año, sin manifestaciones de enfermedad amibiana; en tanto que, las muestras de heces de las 29 no portadoras fueron identificadas como negativas al parásito durante el mismo periodo hasta en un 80% de las ocasiones. Es importante destacar que a pesar de la evidente diferencia respecto a la excreción de quistes, ninguna de las variables sociodemográficas estudiadas (edad, escolaridad, condiciones socioeconómicas y hábitos higiénicos) se asoció de manera significativa a la infección.

Aunque la susceptibilidad a la infección por *E. histolytica/E. dispar* parece ser generalizada, se han invocado, entre otros, factores genéticos para explicar las diferencias geográficas en la distribución mundial de la amibiasis⁴¹. En este sentido, Arellano y colaboradores⁴⁷⁻⁴⁸ identificaron un incremento significativo en el HLA-DR3 y el complotipo SC01 en pacientes mestizos mexicanos con absceso hepático amibiano, cuando fueron comparados con un grupo de mestizos mexicanos sanos del mismo medio socioeconómico. Esto sugiere que al menos en éste grupo étnico, el HLA-DR3 y el SC01 pudieran representar algún tipo de riesgo para desarrollar la forma grave de amibiasis invasora, i.e. absceso hepático amibiano.

RELACIÓN HUÉSPED PARÁSITO:

El peculiar comportamiento de la *E. histolytica*/*E. dispar* respecto a su capacidad para producir daño, se ha explicado fundamentalmente por las propiedades de patogenicidad y virulencia del parásito⁴⁰, o bien por la existencia de factores de riesgo en el hospedero tales como la inmunocompetencia^{36, 49}, sexo⁵⁰, edad^{7,38}, estado nutricional³⁶, embarazo⁵¹, y condiciones sanitarias^{15, 17, 36}.

Los factores de virulencia que pueden favorecer la invasión de la *E. histolytica* incluyen la adhesina inhibible por la galactosa, la secreción de proteasas, receptores de la matriz extracelular y un lipofosfoligano de la superficie celular⁵². Se entiende por virulencia al grado con el cual se expresa la patogenicidad⁴⁰, y por patogenicidad a la capacidad de una determinada cepa de ambas para causar enfermedad⁴⁰. No está claro si la amiba requiere estar en contacto directo con las células intestinales para producir efecto citopático. Observaciones *in vivo* muestran que la amiba puede destruir tejidos a distancia, posiblemente por la secreción de sustancias tóxicas para las células epiteliales^{53, 54}, sin embargo, estudios *in vitro* demuestran que las células que no están en contacto con la amiba, permanecen intactas^{55, 56}.

Con respecto al huésped, éste cuenta con mecanismos de defensa efectores e inmunológicos que operan en la amibiasis. Dentro de los primeros están las proteasas pancreáticas, las sales biliares, las mucinas colónicas y las glicosidasas bacterianas, las cuales destruyen la adhesina específica de la galactosa bloqueando la adherencia de la amiba al epitelio colónico⁵². Con relación a los aspectos inmunológicos (humorales) en el diagnóstico de la amibiasis, es generalmente aceptado que la respuesta inmune específica a la *E. histolytica* ocurre sólo como resultado de una invasión tisular^{57, 58} (esto da fundamento a la serología en el diagnóstico de amibiasis), no obstante, el sistema inmunitario asociado a las mucosas puede secretar IgA de forma activa y eficaz aun sin invasión a la mucosa

intestinal⁶⁰, y aunque los principios generales de la inmunidad sistémica son aplicables a los de las mucosas, existen dos diferencias importantes, estas son 1) Los mecanismos de defensa de las mucosas tienen como función principal impedir la entrada del antígeno (exclusión inmune), por lo que esta respuesta no es de tipo esterilizante como la sistémica. 2) Las defensas locales están diseñadas para evitar respuestas sistémicas indeseables (hipersensibilidad y autoinmunidad) ya sea tolerizando o suprimiendo dichas respuestas⁶¹. En el sistema gastrointestinal, el proceso de producción de IgA se inicia por la entrada de antígenos proteicos a las placas de Peyer (sitios inductores), aquí los antígenos estimulan a los linfocitos T específicos de las regiones interfoliculares así como a los linfocitos B de los folículos. Los linfocitos B, en su mayoría se diferencian a células productoras de IgA para entonces migrar hacia los ganglios mesentéricos y luego regresar al intestino localizándose en la lámina propia (sitios efectores)⁶². En los humanos, los anticuerpos IgA secretores aparecen en las secreciones externas aproximadamente 14 días después de la presentación del antígeno al tejido linfoide intestinal⁶⁰ con un decremento de los niveles 45 días después de haber recibido tratamiento⁶; de ahí que la respuesta inmune secretora sea considerada como de valor diagnóstico en las enfermedades infecciosas que afectan las membranas mucosas aun en ausencia de anticuerpos séricos⁶³, empero, la respuesta secretora a *E. histolytica* no ha demostrado diferencias entre portadores asintomáticos e individuos con amibiasis invasiva, ya que los antígenos amibianos desencadenan respuesta inmune secretora aun sin invasión tisular⁶⁴⁻⁶⁶. En este sentido, la detección de anticuerpos IgA en saliva anti-*E. histolytica* ha sido recientemente recomendada como una prueba de alta sensibilidad y especificidad para identificar infección actual, y poder diferenciar entre portadores y no portadores de *E. histolytica* / *E. dispar*; además, es barata y fácil de realizar comparada con el coproparasitoscópico. Esta prueba no distingue

entre infección y enfermedad⁶⁴ de hecho, queda todavía por aclarar, si la respuesta inmune local a la *E. histolytica*/*E. dispar* tiene una función protectora en la amibiasis intestinal o es un epifenómeno.

En cuanto a la respuesta de anticuerpos séricos, en la amibiasis se han detectado anticuerpos de la clase IgG (IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4), IgM e IgA, con el predominio de la IgG⁵⁷⁻⁶⁵. Los títulos elevados pueden persistir desde tres semanas hasta once años después de la quimioterapia⁶⁵, aparentemente los títulos de anticuerpos séricos no correlacionan con el estado clínico del paciente⁴³⁻⁶⁵, así, la prevalencia (20 - 25%) de anticuerpos séricos anti- *E. histolytica* en población no infectada de una área endémica refleja una infección invasora anterior, con *E. histolytica*⁶⁵.

Un análisis seroepidemiológico (hemaglutinación indirecta) realizado (de 1987 a 1991) en 32 estados de la República Mexicana, y que incluyó 67,668 muestras séricas de personas sanas seleccionadas en forma aleatoria mostró una seroprevalencia del 8.41%, con variabilidad (7.93% a 9.89%) geográfica¹⁹. Estos resultados son algo diferentes a los obtenidos por Gutiérrez y colaboradores³⁰ en 1974, quienes usaron contraelectroforesis (CIE) y encontraron una seroprevalencia del 5.9% (2.53% al 9.95%), posiblemente porque incluyeron sólo población urbana y porque el tamaño de la muestra no fue calculado con base en la probabilidad, como se hizo en el estudio arriba citado¹⁹.

Asimismo, se ha demostrado que la titulación de coproanticuerpos y anticuerpos séricos (ELISA) antiamibianos entre individuos sanos y personas con amibiasis intestinal, no permiten diferenciar ambos grupos, en zonas endémicas⁶⁶. Estos resultados tienen consistencia con otras investigaciones, las cuales han encontrado la misma prevalencia de anticuerpos séricos antiamiba entre portadores de la especie patógena y sujetos no infectados (de la misma área endémica).

probablemente como reflejo de una infección asintomática previa con la especie patógena^{43 58}. Debe señalarse que la característica "asintomático" no descarta pequeños incidentes invasivos los cuales por su naturaleza subclínica constituyen un predicamento en todos los estudios epidemiológicos de amiba, empero, es razonable considerar la baja frecuencia de tales eventos^{43 44 58 67}.

Las técnicas que se utilizan en la búsqueda de anticuerpos específicos van desde la fijación del complemento, pasando por el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) hasta la inmunoelectrotransferencia. Considerándose en la actualidad el estudio de ELISA como la mejor prueba en serología amibiana⁶⁸, ya que tiene la ventaja de usar un antígeno amibiano bien definido⁶⁹ lo que la hace ser más sensible (S =100%) que la hemaglutinación indirecta (S=86.9%) al compararse ambas con el diagnóstico de absceso hepático amibiano⁶⁸.

La limitada consistencia en los resultados de la mayoría de las técnicas utilizadas, se explica por la utilización de antígeno total de amiba, el cual resulta ser muy heterogéneo, pues es obtenido de diferentes formas, diferentes cepas y en ocasiones no es tratado con inhibidores de proteasas; además, de las diferentes formas de extracción del antígeno (congelación-descongelación, homogeneización de los trofozoitos a diferentes velocidades)⁷⁰. Estas limitantes dificultan la interpretación de resultados obtenidos mediante reacciones inmunológicas en áreas endémicas. Hasta el momento no se cuenta con pruebas que constituyan un factor predictivo de amibiasis intestinal en zonas donde la amibiasis se comporta en forma endémica.

A la fecha, a pesar de las propuestas para mejorar el serodiagnóstico en estudios epidemiológicos, *v gr* la identificación y purificación de fracciones antigénicas de 62 y 136 kDa en portadores asintomáticos⁷¹; proteínas recombinantes

(características de zimodemos patógenos y no patógenos) como RecM17¹², RecSREHP¹³, RecEHP1¹⁴, P1-EIA¹⁵; aún se requieren de estudios epidemiológicos para demostrar la validez de las nuevas pruebas diagnósticas en todo el espectro de la entidad nosológica en cuestión.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD:

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en humanos es también conocido como sistema HLA (human leukocytes antigens), una unidad génica extremadamente polimórfica localizada en el brazo corto del cromosoma 6 (ocupa una región de aproximadamente 2cM). Los genes del MHC se agrupan en tres regiones denominadas clase I, clase II y clase III^{76, 77}. Los loci clase I (A, B, C) codifican para la síntesis de antígenos que funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de los antígenos (tumoraes o virales) por los linfocitos T citotóxicos que expresan el marcador CD8⁷⁷. Los loci clase II (DR, DQ, DP) codifican a las moléculas encargadas de presentar los péptidos procesados sobre la superficie de los linfocitos T que expresan el cofactor CD4 y que cooperan o suprimen la respuesta inmunitaria^{77, 78}; otros genes de la región clase II incluyen a los transportadores de péptidos (TAP1, TAP2) y a los proteosomas (LMP2, LMP7)^{77, 78}. Los genes clase III gobiernan la síntesis de varios factores del complemento (C2, C4A, C4B de la vía clásica y el factor Bf de la vía alterna). Algunos complotipos están asociados con ciertos haplotipos HLA, por lo que pueden resultar de interés en genética de poblaciones, en transplantes o en asociaciones de HLA con diversos padecimientos⁷⁷. Genes adicionales que han sido localizados en esta región incluyen al factor de necrosis tumoral (TNF alfa y beta) y a la proteína de choque térmico (HSP-70), el primero tiene una diversidad de funciones como por ejemplo: interviene en la destrucción de células tumorales, estimula la biosíntesis de las proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria, induce fenómenos de trombosis local, etc; la segunda parece intervenir en forma muy importante en el transporte de péptidos a los compartimentos intracelulares adecuados facilitando su interacción con las moléculas clase II para que estas efectúen su función de presentar el antígeno⁷⁷.

Con el descubrimiento de la estructura tridimensional de los complejos peptídicos del MHC mediante la cristalografía por rayos X (en la década de los ochentas) ha sido posible identificar los principios generales y las variaciones específicas que gobiernan la interacción del complejo formado por péptidos extraños y moléculas del MHC con los receptores de los linfocitos T y otras moléculas inmunoreguladoras⁷⁹.

ASOCIACIÓN HLA-ENFERMEDAD:

Hace más de veinte años que se descubrió la participación de los antígenos HLA en la susceptibilidad a diferentes enfermedades, y a partir de 1972 las asociaciones HLA - enfermedad han incrementado en forma impresionante. Hasta el momento se han estudiado más de 500 entidades clínicas, de las cuales la asociación con HLA está confirmada en más de 70⁸²; dichas enfermedades se pueden clasificar en:

- 1) Padecimientos con alteraciones inmunológicas de cualquier naturaleza (inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, alérgicas, etc) relacionadas con genes DR, DQ o DP.
- 2) Enfermedades metabólicas y deficiencias de complemento (hemocromatosis, hiperplasia suprarrenal, deficiencias de C2, C4) que se deben a la alteración o delección de un solo gen.
- 3) Tumores malignos sólidos o hematológicos que dependen del locus A y de las moléculas clase II.
- 4) Enfermedades infecciosas y parasitarias que pueden tener participación de clase I o clase II. Dentro de las enfermedades parasitarias, la mayoría de los estudios que se han realizado a la fecha han sido efectuados en helmintos como *Trichinella* (relacionada tanto con genes H-2 como con genes fuera de MHC, en ratones)⁸¹, y protozoarios i.e *Plasmodium* (en niños africanos se ha observado asociación de los antígenos clase I con resistencia a la malaria)⁸²⁻⁸⁴, *Trypanosoma cruzi*⁸⁵, *Toxoplasma*

*gondii*⁸⁶, *Leishmania*⁸⁷ y *Giardiasis muris*⁸⁸ (cuya resistencia en ratones se ha relacionado tanto con genes del H-2 como con genes fuera de MHC).

Más recientemente, con el descubrimiento de otros genes HLA Clase II, tales como TAP y LMP se han hecho nuevas investigaciones tratando de dilucidar el papel que juegan éstos dentro de las asociaciones HLA-enfermedad⁸⁹. Quizás el hallazgo más espectacular desde el punto de vista de la investigación básica, ha sido la observación de la unión de los péptidos inmunogénicos a los antígenos HLA, permitiendo aclarar el fenómeno de restricción⁷⁶.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de los alelos del MHC en el establecimiento de la susceptibilidad a las enfermedades⁹⁰. Entre estas hipótesis se encuentran

a) La hipótesis de **similitud molecular**, la cual explica la susceptibilidad mediante reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno HLA.

b) **Antígenos HLA como receptores**, esta hipótesis plantea la posibilidad de que algunos antígenos HLA actúen como receptores específicos para agentes infecciosos y de esta forma relacionarse directamente con la enfermedad.

c) **Modificación de la estructura de los antígenos HLA**, sugiere que los antígenos extraños pueden producir alteraciones químicas en las moléculas HLA capaces de ser detectadas por el sistema inmunológico como no propias, respondiendo por lo tanto, con la producción de autoanticuerpos y la generación de la enfermedad⁹¹.

d) **Genes de la respuesta inmune**, los antígenos HLA participan en la regulación de la respuesta inmune, consecuentemente, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmune podría involucrar a los antígenos HLA y explicar su asociación con una predisposición a la enfermedad⁹².

Desde luego, ninguna hipótesis en forma aislada explica todas las relaciones que se han registrado y bien pudiera ser que cada uno de estos mecanismos, esté

involucrado ya sea en uno o varios de los procesos de enfermedad asociados con el MHC

ANTÍGENOS HLA E INFECCIÓN AMIBIANA:

La asociación antígenos HLA e infección amibiana ha sido estudiada solo en ratones, al respecto Ghadirian y colaboradores⁹³ inocularon en intestino grueso de ratones cepas axénicas de *E. histolytica* (HM-1-L3), el número de trofozoitos de *E. histolytica* fueron cuantificados cinco días después de la inoculación intracecal. Las cepas de ratón susceptibles fueron C3H/HeCr, BALBc, NZB BIN, B10.A, DBA2 y C57BL/6, mientras que las cepas AJ, CE, DBA 1 y CD-1 fueron relativamente resistentes. No encontraron asociación entre los haplotipos del H-2 y la susceptibilidad a amibiasis, esto indica que el complejo principal de histocompatibilidad no tiene una función en la regulación de la fase de respuesta a la infección por *E. histolytica*, sin embargo, los hallazgos son compatibles con la hipótesis de que la susceptibilidad a la infección por *E. histolytica* pudiera estar controlada por un gen dominante no relacionado al MHC, tentativamente designado Enh, este gen posiblemente controle algunas funciones asociadas con la resistencia natural a la infección amibiana. En humanos, la susceptibilidad genética en la amibiasis se ha estudiado únicamente en relación a absceso hepático amibiano, observándose una asociación con el antígeno HLA-DR3 y el complotipo SC01, codificados dentro de la región MHC⁴⁶, sin embargo, la participación de estos genes u otros, dentro o fuera del sistema HLA asociados con la susceptibilidad a la amibiasis en otros grupos étnicos, no ha sido investigada.

III. JUSTIFICACIÓN

La amibiasis constituye un problema de salud pública a nivel mundial.

En nuestro país la infección por *E. histolytica/E. dispar* se ha estimado con una prevalencia del 10 al 20% (lo cual equivale a un máximo de 16 millones de infectados)¹¹. Se ha señalado además, que en comunidades endémicas la incidencia de infección amibiana es del 20% o más, con una tasa de reinfección por arriba del 40% en seis meses⁴¹⁻⁴³.

El grueso de las investigaciones sobre amibiasis en el último decenio, está dirigido básicamente al estudio del parásito más que a su único reservorio, el hombre. Suelen citarse aspectos de la historia natural de la enfermedad, sin hacer referencia particular al estado de portador, por lo que es conveniente contar con estudios epidemiológicos que permitan identificar, si además de los factores de riesgo ya establecidos (higiénicos, saneamiento ambiental, estado nutricional, edad, nivel socioeconómico, virulencia del parásito, etc.) el sistema principal de histocompatibilidad también se relaciona con el estado de portador asintomático de *E. histolytica/E. dispar*.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en los antecedentes antes relacionados conviene hacer énfasis en tres aspectos

- 1) En nuestro país, así como en otras naciones en desarrollo, la amibiasis continúa siendo un problema de salud. El 90% de los individuos con esta parasitosis son portadores asintomáticos de *E. histolytica*/*E. dispar*.
- 2) En la literatura hay investigaciones que sugieren una posible asociación del HLA-DR3 con la susceptibilidad a desarrollar absceso hepático amibiano.
- 3) Hemos documentado que bajo el mismo ecosistema parece que solo ciertos individuos adquieren el parásito y permanecen en forma más o menos prolongada (i.e. un año) como portadores asintomáticos de *E. histolytica*/*E. dispar*. lo cual pudiera estar determinado por diferencias genéticas.

Por lo anterior, conviene identificar la posible existencia de un marcador génico de protección o de susceptibilidad para adquirir la infección por el protozooario, además, si tomamos en cuenta que la amibiasis intestinal no invasora representa una fase importante dentro del espectro de la enfermedad, cabe preguntarse si

¿Existe asociación entre los antígenos HLA-A, B, DR, y complotipos con el estado de portador asintomático de *E. histolytica*/*E. dispar* en la población mestiza mexicana?

V. HIPÓTESIS

El 35.5% de los mestizos mexicanos con absceso hepático amibiano (*versus* 12.7% de la población general del mismo grupo étnico, $p < 0.05$) son portadores de un gen de susceptibilidad asociado con el MHC. Con base en estos hallazgos se puede conjeturar que la adquisición y retención prolongada de *E. histolytica/E. dispar* (aun sin el desarrollo de la enfermedad, i.e. estado de portador asintomático) pudiera estar regulado de alguna manera y probablemente en conjunto con otros factores de riesgo por el complejo principal de histocompatibilidad. Por ello se estudiaron las frecuencias de los antígenos HLA Clase I, II y de alotipos en población mestiza mexicana con infección amibiana asintomática prolongada y sin ella.

VI. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Determinar el grado de asociación entre los antígenos HLA- A, B, DR, y complotipos con el estado de portador asintomático de *E. histolytica/E. dispar*

- **Objetivos específicos:**

- 1 Evaluar las frecuencias de antígenos HLA- A, B, DR y complotipos en una población de mestizos mexicanos
- 2 Identificar el tipo de especie infectante (*Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*) mediante la técnica de PCR
- 3 Determinar las diferencias existentes entre portadores y no portadores de *E. histolytica/E. dispar* con respecto a la respuesta serológica (anti-IgG e IgA séricas, así como anti-IgA secretora)
- 4 Identificar algunos factores de riesgo asociados al estado de portador asintomático de *E. histolytica/E. dispar*

VII. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO:

Se llevó a cabo en adultos derechohabientes de las Unidades de Medicina Familiar 31 y 23 del Instituto Mexicano del Seguro Social en el Valle de México, las cuales atienden a la población que vive en zonas aledañas a las clínicas (Delegaciones de Iztapalapa y Gustavo A. Madero)

2. DISEÑO DEL ESTUDIO:

CASOS Y CONTROLES, seleccionados a partir de cohortes

2.1 GRUPOS DE ESTUDIO:

Inicialmente y mediante muestreo al azar se entrevistaron 2,600 personas (fase de escrutinio). Los individuos participantes que cumplieron con los criterios de selección, fueron incluidos en forma consecutiva de acuerdo a su identificación como portadores de *E. histolytica*/*E. dispar* - CASOS- y no portadores del protozooario -CONTROLES-. La asignación inicial a uno u otro grupo dependió de la presencia de quistes del parásito en una de las tres muestras consecutivas de heces o de la ausencia de cualquier parásito en el mismo número de coproparasitoscópicos. Los controles fueron pareados por edad, sexo y condición socioeconómica⁹⁴

A. CASOS

A1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mestizos mexicanos, mayores de 18 años de edad, adscritos a las Unidades de Medicina Familiar 23 y 31 del Instituto Mexicano del Seguro Social, que:
- Se identificaran como portadores de *E. histolytica*/*E. dispar* mediante la presencia de quistes del parásito (coproparasitoscópicos, técnica de Faust-Ferreira)⁹⁵, en al menos una ocasión más durante la fase de seguimiento, para lo cual entregaron una muestra de heces fecales cada mes durante un año.
- Negaran sintomatología gastrointestinal como demanda de consulta médica.
- Estuvieran de acuerdo en participar en el estudio, a través de la firma de consentimiento informado.
- Incumplimiento en la entrega de muestras en no más de cuatro ocasiones consecutivas a lo largo del seguimiento.

A2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Mujeres embarazadas.
- Sujetos con enfermedades por inmunodeficiencia primaria vgr.: agammaglobulinemias congénitas, síndrome de Di George, etc., o inmunodeficiencia secundaria e.g.: cáncer, SIDA, insuficiencia renal crónica, agranulocitosis, anemia aplásica, anemia de células falciformes, lupus eritematoso, etc.

- Pacientes con ingesta de medicamentos inmunosupresores o medicamentos que interfirieran con la identificación del parásito, tales son laxantes, enemas, antidiarreicos como los compuestos con caolín o bismuto antiácidos, sulfato de bario, antiamibianos y medicamentos antimicrobianos como la tetraciclina y las sulfonamidas.
- Aun cuando hayan sido caracterizados como casos se negaran a la toma de muestras sanguíneas para la tipificación de antígenos HLA

B. CONTROLES

B1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Mestizos mexicanos mayores de 18 años de edad
- Adscritos a las Unidades de Medicina Familiar 23 y 31 del Seguro Social, en el Valle de México.
- Con coproparasitoscópicos negativos en el 100% de los exámenes realizados (36 CPS en 12 meses). Técnica de Faust-Ferreira⁶⁵.
- Negaran sintomatología gastrointestinal como demanda de consulta médica
- Estuvieran de acuerdo en participar en el estudio a través de la firma de consentimiento informado.
- Incumplimiento en la entrega de muestras en no más de cuatro ocasiones consecutivas a lo largo del seguimiento

B2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Mujeres embarazadas
- Sujetos con enfermedades por inmunodeficiencia primaria *vgr.*: agammaglobulinemias congénitas, síndrome de Di George, etc., o inmunodeficiencia secundaria *e.g.*: cáncer, SIDA, insuficiencia renal crónica, agranulocitosis, anemia aplásica, anemia de células falciformes, lupus eritematoso, etc.
- Pacientes con ingesta de medicamentos inmunosupresores o medicamentos que interfirieran con la identificación del parásito², tales son: laxantes, enemas, antidiarreicos como los compuestos con caolín o bismuto, antiácidos, sulfato de bario, antiamebianos y medicamentos antimicrobianos como la tetraciclina y las sulfonamidas.
- Aun cuando hayan sido caracterizados como casos se negaran a la toma de muestras sanguíneas para la tipificación de antígenos HLA.

2.3 TAMAÑO DE MUESTRA*

- Probabilidad máxima de cometer error tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando esta en realidad es verdadera) o nivel alfa, $\alpha = 0.05$
 - Probabilidad máxima de incurrir en error tipo II (no rechazar la hipótesis nula cuando esta en realidad es falsa) o nivel beta = 0.20
 - P1 = Probabilidad de encontrar HLA-DR3 en portadores asintomáticos de *Entamoeba histolytica*, 35.5%
 - P2 = Probabilidad de encontrar HLA-DR3 en no portadores de *Entamoeba histolytica*, en mestizos mexicanos, 12.7%.
 - P = El promedio entre P2 y P1 = 0.24
 - Q = Fue especificado por la diferencia obtenida de los valores P1 y P2 = 0.76
 - r = La relación caso-control fue de 1:1, por lo que $r = 1$
- Los valores de P1 y P2 fueron calculados con base en los hallazgos de estudios previos en mestizos mexicanos y HLA-absceso hepático amibiano³⁷⁻³⁸.

Fórmula:
$$m' = \left[\frac{c_{\alpha} + (r+1)PQ - c_{1-\beta} \left(rP_1Q_1 + P_2Q_2 \right)}{r(P_1 - P_2)^2} \right]^2$$

El tamaño de la muestra fue de: 126

63 casos y 63 controles

3. DEFINICIÓN DE VARIABLES:

3.1 Variable dependiente, estado de portador asintomático de *E. histolytica*/*E. dispar* (en mestizos mexicanos)

3.2 Variable independiente: antígenos HLA-Clase I (A, B, C), Clase II (DR, DQ) y Clase III (complotipos)

3.3 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

- **Infeción o estado de portador asintomático de *E. histolytica*/*E. dispar***, presencia de quistes del parásito, identificados por coproparasitoscópicos (técnica de Faust-Ferreira)⁹⁶, en por lo menos una vez más, durante el año de seguimiento.
- **No portador de *E. histolytica*/*E. dispar***, ausencia del protozoario en el 100% de los exámenes realizados durante un año de seguimiento, técnica de Faust-Ferreira⁹⁶.
- **Mestizo mexicano**⁹⁷, hijo de padres y abuelos mexicanos, identificado a través del interrogatorio directo.
- **Nivel socioeconómico**⁹⁴, determinado con base en el índice tricotómico, con información de seis variables: "índice de hacinamiento" (número de cuartos y personas en la vivienda), "índice de condiciones de la vivienda" (material del piso, disponibilidad de agua potable, forma de eliminación de excretas), estos dos índices junto con la "escolaridad del jefe de la familia" conforman el índice de nivel socioeconómico (índice de Bronfman)

- **Higiene**, evaluada mediante cuestionario previamente validado³⁷ que identifica hábitos higiénicos a través de interrogatorio e.g. alimentación en vía pública, ingesta de agua hervida, y hábitos en el aseo de manos tanto antes de comer como para preparar alimentos y después de ir al baño.
- **Diarrea**⁹⁸, aumento en el número de evacuaciones emitidas en 24 horas (dos o más de lo habitual) acompañadas de cambios en su consistencia con o sin la presencia de moco o sangre. Operativamente, a todos los episodios de diarrea reportados (con moco o sangre) se les realizó amiba en fresco.
- **Cumplimiento**⁹⁹: se ha definido al cumplimiento como el proceso a través del cual el paciente lleva a cabo las indicaciones dadas por el médico. En este estudio se consideró cumplimiento cuando la muestra de heces no era menor de 5g, y no tenía más de 10 horas de haberse recolectado, esto último aunado a la refrigeración de las mismas hasta el momento de la entrega.
- **Determinación de anticuerpos anti-amiba**, estos fueron detectados por el método de ELISA usando antígenos *E. histolytica* HM1: IMSS. Las muestras estudiadas fueron saliva y suero. Para la determinación de anticuerpos secretores en saliva primeramente se cuantificó la IgA total en cada una de las muestras con la finalidad de homogenizar a 0.05 mg/ml la cantidad de IgA. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó utilizando IgA antihumana conjugada a peroxidasa (Zymed Laboratories Co, San Francisco Ca USA). La reacción se reveló después de adicionarle la solución de sustrato preparada con 1 mg/ml de o-fenilendiamine en 0.1M en solución amortiguadora de citratos 0.1M con un pH de 4.5, se utilizó IgA antihumana específica contra isotipos conjugados para afinar

la purificación de anticuerpos IgA. En relación a la titulación de anticuerpos séricos anti-IgG y anti-IgA se emplearon placas con pozos cubiertos con 50 μ l de extracto de amiba insoluble en buffer de carbonatos 0.01 M, pH 9.6, a cada pozo se le agregó 50 μ l de esta suspensión, incubándose 2.30 h a 37°C, para después lavarse una vez con PBS-BSA-TWEEN y luego dos veces con PBS-TWEEN Posteriormente, los pozos se bloquearon con PBS leche al 5%, se incubaron toda la noche a 4°C. A continuación y previo lavado de los pozos, se adicionaron 50 μ l de la muestra y se incubaron durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente, los pozos se lavaron y se les añadió 50 μ l de anti-IgG humana peroxidado (Cappel, Pa., USA) a una dilución de 1:1000, o anti-IgA humana peroxidado (Cappel, Pa., USA) a una dilución de 1:2000, para incubar nuevamente durante 60 minutos. Los anticuerpos (anti-IgG y anti-IgA) se utilizaron a las diluciones que previamente habían dado lecturas de densidad óptica -D.O.- A 490 nm similares, cuando se probaron con concentraciones iguales de las inmunoglobulinas respectivas. Finalmente se añadieron 50 μ l de sustrato (10ml de solución amortiguadora de citratos 0.1M, pH 4.5, adicionada de 10mg de O-Fenilendiamina (sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) y 4 μ l de H₂O₂ al 30% (Merck de México, S.A.) la reacción se dejó transcurrir hasta observar la aparición de color (aproximadamente 15 minutos), se bloqueó la reacción añadiendo 200 μ l de H₂SO₄ 1M (Merck de México, S.A.) por placa.

La densidad óptica (para todos los anticuerpos) fue leída en un microlector de ELISA (EL 312e, instrumentos Bio-Tek) a 490 nm. Los diferentes valores de los puntos de corte para cada una de las pruebas fueron establecidos de acuerdo al

promedio obtenido más dos desviaciones estándar en el grupo de controles

- **Antígenos HLA Clase I y II.** Pertenecen al grupo de antígenos HLA Clase I, las moléculas A y B, y a los clase II, las moléculas DQ y DR. La tipificación fue efectuada por el método de microcitotoxicidad en dos pasos¹⁰⁰, se utilizaron placas de tipificación HLA (PelFreez, Roger Arkansas, EE.UU.), cubriendo 17 antígenos HLA-A, 30 HLA-B, 13 HLA-DR y 5 HLA-DQ. Los antígenos HLA Clase I fueron determinados en linfocitos aislados de sangre periférica por separación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y los antígenos HLA Clase II fueron determinados en linfocitos B usando Lympho-Kwik-B (One lambda Inc., Los Angeles Ca., USA)
- **Complotipos,** corresponden a las proteínas del complemento C2, C4 y Factor B, antígenos codificados por la región HLA Clase III. Los complotipos fueron evaluados en plasma EDTA. Las variantes C2 fueron identificadas por isoelectroenfoque en un gel de acrilamida (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido de ensayo hemolítico en la zona de migración de C2 usando eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpo específico y complemento deficiente en C2. Las variantes polimórficas de C4A y C4B fueron determinadas por electroforesis de muestras de plasma, desializadas con neuraminidasa de *C. Perfringes* tipo VI (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido de inmunoprecipitación con antisuero específico anti C4 (Atlantic Antibodies, Scarborough, MN, USA). Finalmente la tipificación de las variantes del factor B fueron a través de electroforesis en gel de agarosa usando un buffer veronal alcalino seguido de inmunoprecipitación con

suero específico antifactor B humano (Atlantic Antibodies, Scarborough, MN, USA)

- **Frecuencia antigénica**¹⁰¹, es la proporción de sujetos del total que son portadores de determinado antígeno, y expresa lo que parece existir en cierto locus. Lo que realmente existe es la combinación de dos genotipos (uno heredado por el padre y otro heredado por la madre)
- **Frecuencia génica**¹⁰¹, define las proporciones alélicas en un locus, i.e., la contribución genética a la descendencia.
- **Desequilibrio de ligamiento**¹⁰⁶, indica que existe una asociación preferencial entre alelos de diferentes loci. Los alelos segregan juntos en un mismo haplotipo, dependiendo de la distancia que existe entre ellos
- **Tipo de especie infectante**¹⁰², la amplificación del ADN de *E. histolytica* y *E. dispar* fue a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se usaron sondas específicas para cada una de las especies obtenidas de una clona de HM-1:IMSS y SAW 1734R respectivamente.

4. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Como estrategia para la selección de casos y controles, el estudio tuvo dos etapas. La primera, para la formación de grupos, incluye la fase de escrutinio y de seguimiento. La segunda etapa corresponde directamente a las acciones realizadas para dar respuesta a la pregunta de investigación.

4.1 PRIMERA ETAPA "FORMACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO (CASOS Y CONTROLES)".

FASE DE ESCRUTINIO

Se inició con 2,600 individuos que aportaron muestras de heces. Estos pacientes fueron elegidos cuando acudían a consulta externa de Medicina Familiar de sus respectivas clínicas, ya sea por entidades nosológicas no gastrointestinales o como acompañantes. A todos ellos se les aplicó un cuestionario que incluía variables como edad, sexo, lugar de residencia, escolaridad, ocupación, condiciones de la vivienda, nivel socioeconómico, hábitos higiénicos y antecedentes de amibiasis invasora.

FASE DE SEGUIMIENTO:

A los individuos que reunían los criterios de inclusión (portadores y no portadores) se les inició la recolección de muestras de heces, por tres días consecutivos, cada mes, durante un año.

La técnica para el procesamiento de CPS fue la de Faust-Ferreira⁹⁵. Cuantificándose al inicio y a los seis meses la variabilidad interobservador a través de la prueba de kappa¹⁰³ ($k = 0.46$ a 0.59 , valores que reflejan buen acuerdo).

Las personas con uno o más resultados positivos (a *E. histolytica*/*E. dispar*) de CPS o cultivos de Robinson al término del seguimiento, fueron consideradas como casos. Contrario a esto, los sujetos con el 100% de muestras negativas a *E. histolytica* / *E. dispar* formaron parte del grupo control.

Durante cada entrevista (mensual) se registraron las condiciones de la vivienda, higiene y características socioeconómicas, así como el estado clínico de los sujetos participantes. Ante la presencia de enfermedad diarreica, se brindó atención médica y se colectaron las muestras de heces para identificar trofozoitos hematófagos, mediante el examen de ameba en fresco, sin la búsqueda de otra etiología bacteriana o parasitaria que explicase el episodio diarreico.

En las visitas domiciliarias, las personas encargadas de la aplicación de los cuestionarios y de la recolección de muestras, desconocían el grupo al que pertenecían las personas bajo estudio. De igual manera, las técnicas de laboratorio se realizaron en forma ciega con respecto a las condiciones clínicas de los pacientes y al grupo de referencia (casos o controles). Los cuestionarios fueron validados antes de su aplicación y todos los procedimientos (entrevistas, recolección y almacenamiento de muestras, etc.) se efectuaron previa estandarización de criterios operativos.

4.2 SEGUNDA ETAPA

CUANTIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SÉRICOS (IgA e IgG), se obtuvieron 3 ml de sangre al inicio y cada seis meses durante el período de seguimiento. Los anticuerpos anti-amiba se detectaron por el método ELISA usando antígenos E *histolytica* HM1 IMSS.

CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS SECRETORIOS (IgA en saliva), se colectó mensualmente una muestra de 5ml de saliva, congelándose a -70°C hasta su procesamiento. Los anticuerpos anti-amiba se detectaron por el método ELISA usando antígenos E *histolytica* HM1 IMSS.

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Una vez integrados los grupos de estudio, se procedió a la toma de muestras sanguíneas - 20ml de sangre por punción venosa - para la tipificación de los antígenos HLA Clase I y II por el método de microinfocitotoxicidad y la obtención de plasma para la determinación de genotipos.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS DE LA PRIMERA ETAPA:

En el análisis de las características sociodemográficas se obtuvieron las frecuencias simples de las diferentes variables. Como medida de asociación para las variables cualitativas (sexo, ocupación, condiciones de la vivienda, nivel socioeconómico, higiene, etc.) se calculó la razón de momios (OR) y el intervalo de confianza al 95% según el método de Cornfield¹⁰⁴. El nivel de significancia utilizado fue para una $p < 0.05$, producto de las pruebas chi de Mantel-Haenzel y prueba exacta de Fisher¹⁰⁵. Así mismo, la comparación de promedios de las edades fue a través de la prueba de distribución t ¹⁰⁵. También, las mismas variables sociodemográficas fueron usadas para construir un modelo predictivo de regresión logística (método forward) con un nivel de significancia de 0.05, el cual permitió cuantificar el riesgo que representa cada una de las variables explicatorias^{105, 106}.

Con el objetivo de conocer la variabilidad del estado de positividad a *E. histolytica* a través del tiempo se realizó la prueba de correlación de rangos de Spearman¹⁰⁵.

Se calculó densidad de incidencia para estimar el riesgo que tienen los individuos bajo estudio de cursar con diarrea a lo largo de un año.

ANÁLISIS DE LA SEGUNDA ETAPA:

CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIAMIBA, se obtuvo la distribución de frecuencias simples de los valores de densidad óptica de cada una de las mediciones, como medida de tendencia central se utilizó la mediana. Las comparaciones de las medianas entre grupos fue realizada a través de la U. Mann Whitney y la prueba de rangos de Spearman para correlacionar los valores de densidad óptica a través del tiempo. El punto de corte fue el resultado del promedio más dos desviaciones estándar de la densidad óptica del grupo de controles, calculándose el coeficiente de variación¹⁰⁶ para determinar la validez de cada medición.

CÁLCULO DE LA ASOCIACIÓN ANTÍGENOS HLA Y ESTADO DE PORTADOR ASINTOMÁTICO DE *E. HISTOLYTICA* *E. DISPAR*

El análisis del complejo principal de histocompatibilidad incluyó

- a) Frecuencias antigénicas, calculadas como la proporción de sujetos portadores de un determinado antígeno del total de individuos estudiados¹⁰¹
- b) Frecuencias génicas, las cuales se calcularon con la siguiente ecuación.

$$p = 1 - \sqrt{1 - f}$$

donde A corresponde a la frecuencia antigénica y p a la frecuencia génica¹⁰¹.

- c) Se cuantificó el grado de asociación entre los antígenos HLA e infección amibiana a través de la razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95%¹⁰¹, la significancia estadística entre los casos *versus* controles se calculó mediante la prueba de chi cuadrada o prueba exacta de Fisher (esta última se aplicó en los casos

en donde alguno de los valores esperados de la tabla de 2x2 fuera < 5); los valores de p (menores a 0.05) así obtenidos fueron corregidos (pC) por la multiplicación con el número de especificidades estudiadas (corrección de Bonferroni)⁸⁹.

d) El desequilibrio de enlace se estimó de acuerdo a la fórmula de **Mattiuz** y col. (1970), para individuos no relacionados¹⁰¹:

$$\Delta = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{b+d}{n} \times \frac{c+d}{n}}$$

e) Las frecuencias de las fracciones haplotípicas fueron obtenidas mediante la siguiente ecuación $P_{ij} = P_i \times P_j + \Delta$, donde P_i y P_j son los genotipos de cada combinación antigénica. La significancia de los valores de delta fue obtenida a través de tablas de contingencia de 2x2 y chi cuadrada¹⁰¹.

VIII. RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS COHORTES DE ESTUDIO

Escrutinio:

Entre mayo de 1993 y julio de 1994 se realizaron 4,526 entrevistas, lográndose obtener muestras de heces en 2,599 individuos (57.4%). La prevalencia de *E histolytica*/*E dispar* determinada por coproparasitoscópico fue del 4.3%

Formación de grupos (casos y controles):

Se reclutaron 102 sujetos con coproparasitoscópicos positivos a *E histolytica* /*E dispar* y 95 con coproparasitoscópicos negativos, prevaleció (80%) el género femenino en ambos grupos. Todos ellos completaron 12 meses de seguimiento, con un 96% y 97% de cumplimiento respectivamente. De acuerdo al patrón de eliminación de quistes se conformaron tres grupos: 1) Portadores crónicos persistentes, aquellos que presentaron CPS positivos al protozoario en más del 50% de las muestras, n=23; 2) Portadores intermitentes, los que en forma intercalada presentaron CPS positivos y negativos durante el tiempo de seguimiento (de 18% al 50% de positividad), n = 39; y 3) Portadores transitorios, sujetos con una o dos muestras ($\leq 17\%$) positivas durante los 12 meses de seguimiento, n=40

Para fines de este estudio fueron elegidos de acuerdo a su patrón de eliminación de quistes y al consentimiento por escrito del paciente, 19 portadores crónicos persistentes, 25 portadores intermitentes, y 6 portadores transitorios conformando así 52 portadores asintomáticos de *E histolytica*/*E dispar* y 53 controles. Al agrupar

y ponderar las variables como drenaje, agua potable, escolaridad e higiene alimentaria para integrar los índices preestablecidos de condiciones de la vivienda. nivel socioeconómico e higiene observamos una distribución similar de las variables tanto en los casos como en los controles, cuadro 1. Al desagrupar los índices y analizar por separado cada una de las variables sociodemográficas, a través de un modelo de regresión logística se pudo apreciar que, no contar con agua intradomiciliaria y la falta del hábito del lavado de manos después de ir al baño constituyen los principales factores de riesgo para adquirir la infección ambiana, cuadro 2.

Seguimiento de la población estudiada:

El tiempo esperado de seguimiento (si tomamos en cuenta 12 meses por persona) para los 52 casos corresponde a 624 meses/persona y para los 53 controles 636 meses/persona. Al cuantificar el tiempo observado de seguimiento pudimos constatar que el primer grupo contribuyó con 580 meses/persona y el segundo con 568 meses/persona, obteniéndose el 93% y 89% ($p = 0.3$) de cumplimiento respectivamente, con un promedio de 11 muestras entregadas por individuo en ambos grupos de estudio.

Evolución del estado de portador de *E. histolytica* / *E. dispar* y de los controles durante el seguimiento:

Los 52 sujetos portadores de *E. histolytica*/*E. dispar* mantuvieron esta característica, cuando menos una vez más a lo largo del seguimiento. Así, el 47% del total (580) de muestras de heces de éste grupo fueron clasificadas como positivas al protozooario, ya sea a través de coproparasitoscópico o cultivo de Robinson, figura 1. Cabe destacar que ninguno de los integrantes de ésta cohorte presentó evidencia de enfermedad ambiana durante el seguimiento.

El tipo de cepa infectante identificada mediante PCR, se obtuvo en 28 sujetos (54%), y en todos ellos se identificó *E. dispar*.

Los controles mantuvieron su estado de negatividad en el 99.8% del total de muestras (571) a lo largo de los 12 meses de seguimiento. Sólo un sujeto eliminó quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* durante el seguimiento.

Incidencia de diarreas durante el seguimiento:

La frecuencia de diarreas fue del 30% en ambos grupos, y la incidencia de tales episodios fue de 0.02 y 0.03 para casos y controles respectivamente (RR = 0.92; I.C. 95% 0.60-1.43; p= 0.72). Ninguno de los eventos de diarrea estudiados se reportó con sangre ni se identificó *E. histolytica*, cuadro 3.

8.2 ESTUDIO SEROLÓGICO

Anticuerpos anti-*E. histolytica*:

Al comparar las medianas de absorbancia de los anticuerpos IgA séricos anti-*E. histolytica* entre casos y controles con cada una de las mediciones, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, excepto en la segunda medición (a los seis meses) $p = 0.03$. Los valores intragrupo mostraron cambios significativos (siempre por abajo del punto de corte) a lo largo del tiempo, para los casos $r = -0.93$ $p < 0.05$, y para los controles $r = 0.99$ $p < 0.05$. El punto de corte correspondió a una densidad óptica de 0.26nm, con un coeficiente de variación del 4%, figura 2.

La comparación de las medianas de absorbancia de los anticuerpos IgG séricos anti-*E. histolytica*, revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre casos y controles en cada una de las mediciones. Los valores de absorbancia no mostraron cambios significativos a largo del tiempo en el grupo de portadores $r = -0.50$ $p = 0.67$, pero en los controles sí hubo cambios significativos, aunque todos ellos estuvieron por debajo del punto de corte $r = -1$ $p < 0.05$. El punto de corte correspondió a una densidad óptica de 0.28nm, con un coeficiente de variación del 8%, figura 3.

Con respecto a las diferentes medianas de absorbancia de anticuerpos IgA en saliva anti-*E. histolytica*, al compararse casos y controles, estas fueron en sus dos primeras mediciones estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), no así en la tercera medición (a los doce meses) la cual arrojó una $p = 0.27$. El grupo de portadores no mostró cambios significativos de sus valores de absorbancia de anticuerpos a lo largo del tiempo ($r = 0.50$, $p = 0.67$), en tanto que los controles sí evidenciaron

cambios estadísticamente significativos ($r=1$, $p<0.05$) El punto de corte correspondió a una densidad óptica de 0.46nm, con un coeficiente de variación del 4.8%, figura 4.

8.3.COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INFECCIÓN AMIBIANA:

En los cuadros 4, 5, 6 se describen las frecuencias fenotípicas y genotípicas de los antígenos HLA Clase I y II, por grupos de reacción cruzada. No hubo asociaciones primarias o debidas a desequilibrio de enlace con ninguno de los antígenos HLA. Las frecuencias que predominaron fueron para el locus A, el antígeno A2, cuadro 7. En el locus B, el B35 fue el antígeno que prevaleció en los casos y el B39 en los controles, cuadro 8. Dentro de los DR la mayor frecuencia correspondió al DR4, cuadro 9. Las frecuencias del antígeno HLA-DR3 fueron semejantes entre casos (9.6%) y controles (9.4%), cuadro 6. De igual forma, los antígenos clase III que incluyen los factores del complemento, al analizarse tanto en forma aislada (cuadro 10) como en complotipos (cuadro 11) no mostraron diferencias estadísticamente significativas; tal como se puede observar con la distribución del SC01, la cual fue similar entre los grupos de estudio (27% en los casos y 21% en los controles. OR = 1.4, I.C. 95% = 0.69 - 2.81, $p=0.41$).

IX. DISCUSIÓN

9.1 Características generales de las cohortes de estudio:

La prevalencia de infección por *E. histolytica*/*E. dispar* en la población muestreada (4.7%) fue menor a la estimada tanto a nivel mundial (10%)² como a nivel nacional (15%)¹¹, lo cual puede ser explicado por a) Variaciones en la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas (para los métodos de concentración *vg.*: método de flotación de sulfato de zinc, la sensibilidad es del 70% al 80% y para los métodos sin concentración *e.g.*: examen directo de heces, la sensibilidad es del 60%) en los diferentes estudios que intentan estimar la prevalencia de la infección amibiana^{36 107 108}; b) La mayoría de las investigaciones incluyen sólo una muestra de heces de cada uno de los individuos, identificando únicamente del 40% al 50% de los infectados, se ha documentado que cuando se incluyen tres muestras de días diferentes, se detecta del 55% al 65% de las infecciones amibianas, esta probabilidad se incrementa hasta el 80% cuando el total de muestras examinadas por paciente es de seis días diferentes^{107 109}; c) Otro aspecto importante radica en la diferente capacitación técnica entre observadores que conlleva a la identificación de polimorfonucleares o quistes de otro tipo de amibas como quistes de *E. histolytica*/*E. dispar*^{107 109}, una encuesta en varios laboratorios clínicos de la ciudad de México¹¹⁰ revela que por regla general la *E. histolytica*/*E. dispar* y la *E. hartmani* no son apropiadamente diferenciadas (ya que no miden los quistes), errores que repercuten en la sobrestimación diagnóstica de la infección amibiana, y d) La posible repercusión de las intervenciones en salud mediante el programa de agua

limpia y el programa nacional de control de enfermedades diarreicas. Estos programas han influido en la educación para la salud de la familia y el saneamiento ambiental, lo cual se refleja en una disminución de la morbilidad al evitar 25 millones de episodios de diarreas al año¹¹.

Para el cálculo del tamaño de muestra fueron consideradas las frecuencias antigénicas HLA publicadas en las investigaciones realizadas en mestizos mexicanos, adultos, con absceso hepático amibiano^{47 48}. Estimándose una n de 126, esto es: 63 casos y 63 controles. Sin embargo, el estudio se limitó a 105 pacientes (52 casos y 53 controles), alcanzando el 83% del tamaño de muestra propuesto. El análisis de potencia mostró un valor de $1-\beta$ de 0.78. En vista de lo anterior, podemos concluir que la cantidad de pacientes estudiados fue suficiente¹⁰¹ en número (poder de la muestra = 78%) para mostrar la no asociación entre antígenos HLA y el estado de portador asintomático de *E. histolytica*/*E. dispar*, sin incurrir en error tipo II.

9.2 Características generales de los casos y controles:

Ambos grupos difirieron en cuanto a características sociodemográficas, más precisamente, fueron la falta de agua potable intradomiciliaria y la ausencia del hábito del lavado de manos después de ir al baño las variables identificadas como factores de riesgo para adquirir el estado de portador. Asociaciones causales que resultan coherentes con el conocimiento biológico si consideramos que la forma de transmisión del protozooario es via fecal-oral. al respecto, un estudio de revisión¹⁷ que comprende 67 publicaciones que tratan de cuantificar el impacto que tienen acciones

como: aumento en la calidad y cantidad de agua domiciliaria, y el mejoramiento en el manejo de excretas, muestran una reducción sustancial (22%) de las tasas de morbilidad por diarreas como consecuencia de las intervenciones mencionadas, reflejando un mayor impacto (25%) sobre la reducción en la morbilidad infecciosa gastrointestinal con únicamente incrementar la cantidad de agua domiciliaria. Otro estudio de revisión¹⁵ analiza los trabajos relacionados con la asociación existente entre ciertas conductas específicas y la transmisión de enteropatógenos, y señala a el lavado de manos como la conducta más estudiada, investigaciones hospitalarias sugieren que las infecciones entéricas pueden ser endémicas por la ausencia del lavado de manos, de ahí que ciertas conductas específicas sean las responsables de la transmisión de enteropatógenos, y el no lavado de manos es una de tales conductas.

En contraste están los resultados observados en un estudio previo³⁷, el cual a pesar de haber sido realizado en las mismas comunidades y de haberse utilizado los mismos instrumentos de medición referidos en esta investigación, los grupos de estudio no mostraron diferencias sociodemográficas, aun así, su población no es del todo comparable con la nuestra, por referirse a un grupo homogéneo, muy seleccionado de madres jóvenes con hijos menores de un año de edad, donde por lo menos el 80% de ellas eran amas de casa en comparación con las mujeres de nuestro estudio cuyo promedio de edad fue de 40 años y sólo el 30% de ellas se dedicaba a las labores domésticas, situación a la que se suman los diferentes niveles de desarrollo socioeconómico que han presentado esas comunidades a lo largo del tiempo. También llama la atención que para los bajos niveles de

escolaridad, el modelo de regresión logística arroje valores protectores de OR estadísticamente significativos para adquirir el estado de portador, esto puede ser reflejo de un probable sesgo de muestreo que condicione una muestra no representativa del nivel de instrucción educativo real que prevalece en la población estudiada; así, tenemos que en este trabajo la población con primaria completa fue del 24%, en tanto que en el Valle de México se reporta del 18% (INEGI, XI censo general de población y vivienda, 1990), con relación al porcentaje de analfabetas este fue del 21% y 5.2% (INEGI, XI censo general de población y vivienda, 1990) respectivamente.

Prevalció el sexo femenino (por ser las personas que más frecuentemente demandan consulta médica) situación que no afectó la validez de la investigación, por ser una variable que además de tener una distribución homogénea en ambos grupos, se ha reportado^{33 36 44} la no asociación entre sexo e infección amibiana.

9.3 Evolución del estado de portador y no portador de *E. histolytica*/ *E. dispar* durante el seguimiento:

Al evaluar la evolución clínica de las cohortes (52 portadores asintomáticos y 53 testigos) pudimos constatar que mientras en el grupo de no portadores del protozooario, prevaleció el estado de negatividad en el 99.8% del total de muestras a lo largo del seguimiento, sin que se observara tendencia a adquirir y retener la *E. histolytica*/ *E. dispar* o algún otro parásito. En el grupo de casos la positividad se observó en forma consistente durante el seguimiento, con tendencia a eliminar el parásito espontáneamente. Ninguno de ellos presentó manifestaciones de

enfermedad amibiana. Conviene hacer notar que la frecuencia de diarreas fue semejante en ambas cohortes y en ninguno de estos episodios se identificó *E histolytica*.

Por otro lado, al comparar cada uno de los patrones de eliminación de quistes de *E histolytica*/*E dispar* en diferentes puntos de corte en el tiempo (6 y 12 meses) de seguimiento, se identificó que el estado de portador presenta un comportamiento dinámico en cuanto a la eliminación de quistes, y si bien, la clasificación es arbitraria, no hay evidencia suficiente como para pensar de que se trata de grupos independientes. Por lo que, para fines de este estudio, el grupo de casos se consideró como un todo, y solamente nos limitamos a describir tres patrones de eliminación de quistes.

Actualmente se reconoce a la hipótesis dualista como verdadera¹, por lo tanto, se acepta que existen dos tipos diferentes de "portadores asintomáticos" los que albergan y eliminan un microorganismo intrínsecamente inocuo y quienes están colonizados por un parásito "patógeno". Con relación a esto último, hay controversia acerca de la idea de que los portadores asintomáticos de *E histolytica* puedan persistir durante meses sin desarrollar la enfermedad⁴⁰, los que apoyan esta afirmación se refieren a diferentes grados de virulencia de la *E histolytica*^{25, 44, 45}. En nuestro estudio, aparte de identificar *E dispar* mediante PCR en el 54% (n=28) de los sujetos, ninguno de los 52 hospederos estudiados desarrolló enfermedad amibiana durante 18 meses de seguimiento, por lo que de haber estado presente la *E histolytica* en los portadores, estos posiblemente hubieran presentado manifestaciones de enfermedad. Además conviene mencionar que en general la

infección por *E. dispar* es aproximadamente 10 veces más común que la *E. histolytica*¹¹², aunque en contrasentido están los resultados de Acuña y colaboradores³³ quienes encontraron que la mayoría (56%) de los portadores del protozoo albergaban las dos especies (*E. histolytica* y *E. dispar*) y una alta proporción de sujetos (36%) eran portadores de *E. histolytica*, evidenciada por PCR. No identificaron asociaciones entre *E. histolytica* y *E. dispar* con diarrea u otras enfermedades gastrointestinales, esta observación es consistente con los hallazgos de estudios longitudinales prolectivos^{44 45}, los cuales señalan que la enfermedad se desarrolla en uno de 100 individuos quienes son diagnosticados como portadores asintomáticos de *E. histolytica* / *E. dispar* por microscopia de luz¹¹².

9.4 Estudio serológico

Otro aspecto que conviene considerar es el serodiagnóstico, y para una correcta interpretación de este, es esencial recordar lo publicado previamente en el sentido de que no todos los individuos que sufren amibiasis invasora formaran anticuerpos anti-amibianos, i.e. del 10 al 40% de los individuos con colitis amibiana no producen anticuerpos detectables¹¹³, y no todas las personas seropositivas tienen el antecedente de invasión por el protozoo⁵⁸, la frecuencia de una invasión subclínica permanece esencialmente desconocida; además, la persistencia de anticuerpos anti-amiba varía desde pocos meses hasta varios años^{44 58 67}.

Las medianas de IgA sérica mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles en la segunda medición, correspondiente a los seis meses, todas ellas se mantuvieron por debajo del punto del punto de corte, por lo que tal

diferencia carece de significancia clínica; en consecuencia, consideramos que los niveles de IgA sérica fueron similares entre ambos grupos a lo largo del tiempo. Con relación a los anticuerpos IgG anti-*E. histolytica* las medianas fueron estadísticamente diferentes entre casos y controles, esto sugiere tres posibilidades: a) una infección previa por *E. histolytica*, b) colonización intestinal por las dos especies (*E. histolytica* y *E. dispar*), c) la presencia de anticuerpos de reacción cruzada presumiblemente inducidos por infecciones con otros protozoarios, ejemplo: *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, y *Leishmania*⁷⁵⁻¹¹⁴⁻¹¹⁵, o d) una respuesta inmune específica, inducida por *E. dispar*. Trabajos publicados apoyan a la cuarta hipótesis como la de mayor probabilidad de ser verdadera para explicar nuestros hallazgos, i.e., si consideramos los resultados de PCR realizados en una parte de nuestra población los cuales fueron positivos sólo para *E. dispar*, así como, lo observado en un estudio longitudinal previo en la misma comunidad³⁷ y lo reportado en otras investigaciones, todas ellas basadas en portadores asintomáticos donde se ha encontrado el predominio de *E. dispar* (se estima que la *E. dispar* es ~ 7 a 10 veces más frecuente que la *E. histolytica*)⁴⁵⁻¹¹⁶ se apoyaría la sospecha de *E. dispar* como la especie infectante en la muestra estudiada y, la respuesta inmune específica observada como el resultado de la presencia constante del parásito en el intestino, lo cual pudiera haber estimulado una respuesta inmune secretora que eventualmente se reflejara a nivel sistémico, lo cual ha sido observado en otras infecciones intestinales parasitarias no invasoras¹¹⁷⁻¹¹⁸. Este mecanismo, junto con algunas propiedades fisiológicas del colon involucradas en la respuesta inmune local o sistémica, tales como la eficiente absorción de macromoléculas, la presencia de

células M de folículos linfoides solitarios y las características del microambiente, donde la flora bacteriana puede producir grandes cantidades de proteasas¹¹⁹, aunado al hecho de que se ha observado (in vitro) que la *E. dispar* tiene la capacidad de producir aunque a nivel muy superficial erosión de la mucosa del colon²⁵ pudieran explicar razonablemente la respuesta inmunológica humoral durante el estado de portador asintomático de *E. dispar*

En cuanto a la actividad de los anticuerpos IgA en saliva anti-*E. histolytica*, los resultados tienen consistencia con lo publicado^{8,64} y demuestra una vez más, la utilidad de esta prueba para diferenciar entre portadores y controles, sin que se esperen diferencias entre infección y enfermedad, porque se ha demostrado que aun sin invasión los antígenos microbianos pueden desencadenar una respuesta inmune secretoria^{59, 60}.

Con relación a la técnica ELISA utilizada en la determinación serológica, se ha documentado su no utilidad para distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* en portadores asintomáticos en áreas endémicas, tal como lo demuestra un estudio epidemiológico realizado en Turquía¹¹⁴, ellos utilizaron PCR colorimétrica para identificar el tipo de especie infectante y ELISA (emplearon cepas axénicas de *E. histolytica* y *E. dispar* para el serodiagnóstico), sus hallazgos ponen de manifiesto que la infección por *E. dispar* puede inducir anticuerpos séricos anti-*E. histolytica*, la posibilidad de una reacción cruzada, y la no utilidad de la serología para diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* en los portadores asintomáticos de áreas endémicas; sin embargo, nuestros resultados de serología permiten confirmar la diferencia como hospederos de *E. histolytica/E. dispar* entre portadores y controles

9.5 Antígenos HLA y el estado de portador asintomático de *E. histolytica* / *E. dispar*:

Si bien los estudios familiares son más efectivos para establecer una asociación entre antígenos HLA-enfermedad, los estudios de base poblacional también resultan ser de gran valor, siempre y cuando se limiten a un solo grupo étnico y a una misma enfermedad¹⁰¹. Y nuestra investigación (de base poblacional) incluye pacientes del mismo grupo étnico (mestizos mexicanos), con la misma entidad nosológica (infección amibiana) y similitud en las condiciones socioeconómicas, lo cual garantiza validez interna.

Los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias antigénicas y génicas, ni asociaciones secundarias a un desequilibrio de enlace entre casos y controles. Por lo tanto, podemos considerar que aparentemente no existe un antígeno HLA específico que sea capaz por sí mismo de conferir un estado de susceptibilidad o de protección a la infección amibiana, pero sí, un estado de resistencia al absceso hepático amibiano, explicado por la baja frecuencia de HLA-DR3 observada en nuestro estudio (9.6% en los casos y 9.4% en los controles) *versus* 35.5% en adultos con absceso hepático amibiano^{47, 48}. Cabe mencionar que la frecuencia de DR3 en 33 sujetos con rectocolitis amibiana fue del 9.1%⁴⁸, lo anterior permite concluir que al menos en mestizos mexicanos el HLA DR3 y su haplotipo HLADR3 y SC01 pudieran representar factores independientes de riesgo en el huésped, no para cualquier forma de invasión amibiana, sino específicamente para el desarrollo de absceso hepático amibiano.

Existen tres posibilidades que explican la aparente no asociación HLA-ambiasis luminal. La primera se refiere a que dicha susceptibilidad permanezca sin identificarse, esto como consecuencia de que los productos de los genes clase II identificados mediante antisuero aloreactivo -tradicionalmente usado en la tipificación de antígenos- actualmente no representa con exactitud la susceptibilidad genética, si tomamos en cuenta los recientes descubrimientos de variantes polimórficas dentro de un mismo locus HLA, así como el descubrimiento de series adicionales de factores clase II, tales como: DP, TAP, LMP (antígenos no tipificados mediante serología) con los cuales se especula hacia una fuerte asociación HLA-enfermedad. La segunda posibilidad radica en el hecho de que existen factores de susceptibilidad asociados a genes localizados fuera del MHC ej: gene Ehn, encargado del control de la resistencia natural a la infección amibiana (en ratones)⁹³ o la participación del sistema interferón¹²⁰ que expliquen una susceptibilidad no asociada al sistema HLA. Por lo antes señalado, no puede descartarse una probable asociación con genes dentro o en vecindad al MHC en portadores asintomáticos de *E. histolytica*/ *E. dispar*. Finalmente, debe considerarse una posible infección por *E. dispar* que pudiera explicar la aparente no diferencia genética entre los grupos de estudio.

Por otra parte, se sabe que la tipificación serológica de los antígenos HLA clase II identifica alrededor de 14 moléculas de DRB y tres DQB; sin embargo, es incapaz de identificar los subtipos importantes de ciertos alelos DRB1 y usualmente conduce a errores en la asignación hasta en un 25% de los casos, particularmente en los antígenos asociados con DR52, el cual agrupa a una familia de alelos que

comparten secuencias en la primera región hipervariable del segundo exón (Horne and Keown 1993). Si bien, lo anterior es cierto, conviene mencionar que las frecuencias de los antígenos blanco obtenidas en nuestro estudio, resultaron ser bajas y similares en ambos grupos, lo cual refleja, además de una baja incidencia de homocigocidad, eficiencia y calidad de la técnica serológica utilizada¹⁰¹. Es necesario enfatizar que los avances en la tecnología, particularmente en las técnicas de DNA recombinante no excluyen a la tipificación serológica y el no tomar ambas técnicas como mutuamente excluyentes resultará en investigaciones menos costosas y con menor pérdida de tiempo¹⁰¹. Esto se comprueba con los resultados obtenidos en este estudio, donde los antígenos HLA A2, B35 y DR4 fueron los que mostraron las mayores frecuencias antigénicas, y aunque ninguno de ellos mostró asociación primaria o secundaria a desequilibrio de enlace. Con las cifras observadas y el gran polimorfismo de B35¹²¹ y de DR4⁷⁷ convendría realizar estudios moleculares que descarten posibles diferencias en los subtipos de estos antígenos entre casos y controles .

X. CONCLUSIONES

1. Los grupos de estudio presentan diferencias en dos de los factores sanitarios (falta de agua potable intradomiciliaria, y ausencia del hábito del lavado de manos) considerados como de riesgo para adquirir la infección parasitaria
2. El grupo de portadores difirió del de controles, no solo por la presencia o ausencia del parásito, sino también, por poseer títulos mayores de anticuerpos IgG e IgA secretoria anti-*E histolytica*
3. Consideramos que en los sujetos portadores prevaleció la *E dispar*, por las siguientes razones: a) El 50% de los pacientes a los que se les identificó el tipo de especie mostraron *E. dispar*, b) El promedio de los niveles de anticuerpos anti-*E. histolytica* no fueron muy elevados como para pensar en procesos invasivos recientes, c) Ninguno de los sujetos infectados presentó evidencia de enfermedad ambiana a lo largo de un año de seguimiento.
4. Ninguna de las asociaciones HLA-estado de portador asintomático fue lo suficientemente fuerte para hablar de susceptibilidad o resistencia; sin embargo, resultaría interesante descartar posibles diferencias en los subtipos de los antígenos HLA B35 y DR4, dada la frecuencia y el gran polimorfismo de estos antígenos.

5 Finalmente, y si bien, nuestros resultados parecen señalar a los hábitos y costumbres como responsables de las diferencias de la infección por el protozooario, todavía no podemos descartar en forma definitiva la no participación del complejo principal de histocompatibilidad. Por tal motivo se hacen necesarias nuevas investigaciones, dentro del campo de la epidemiología molecular con el propósito de aclarar si la infección asintomática o la reluctancia a ser invadido son debidos a propiedades intrínsecas de una especie específica o a factores del huésped

XI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Weekly Epidemiological record Amoebiasis World Health Organization 1997 72: 97- 100
- 2 Walsh JA Problems in recognition and diagnosis of amebiasis Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986, 8 228-238
- 3 Martínez-Palomo A. La amebiasis como problema de salud pública Bol Mens Epidemiol (Méx) 1986. 1 29-32
- 4 Tanimoto WM, Vázquez-Saavedra JA, Calderon P, Aguirre-García J Resultados de la inoculación al hamster de trofozoitos obtenidos de portadores asintomáticos de *Entamoeba histolytica* Arch Invest Méd (Méx) 1973, 4 (supl. 1) 105-108
- 5 Martuscelli A Frecuencia de los parásitos intestinales en niños de la Republica Mexicana Rev Mex Pediat 1967, 36: 111-117
- 6 Tay J, Salazar-Schetino PM, De Haro-Arteaga Y, Ruiz-Hernández AL Frecuencia de las protozoosis intestinales en México Salud Púb Méx 1978, 20 297 - 337
- 7 Martínez-García MC, Hernández-Velarde R, Castro-Delgado JM, Ramos-Ramírez L, Muñoz O, Gutiérrez G Epidemiology of amebiasis in a rural community of Mexico Serologic and coproparasitoscopic survey Arch Invest Med (Méx) 1986, 17 (supl 1) 369-374.
- 8 Del Muro R, Acosta E, Merino E, Glender W, Ortiz-Ortiz L Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection J Infect Dis 1990, 162 1360-1364
- 9 Navarrete-Espinoza J, Navarrete-Cadena E, Escandón-Romero C, Escobedo de la Peña J Prevalencia de parasitosis intestinal en población infantil de Santiago Jamiltepec, Oaxaca Rev Méd IMSS (Méx) 1993, 31: 157-161
- 10 Islas-Marroquin J Estudio piloto sobre amebiasis y la giardiasis en el personal militar Rev Sanid Milit Méx 1993, 47 123-125
- 11 Gutiérrez G Amebiasis intestinal Bol Mens Epidemiol (Méx) 1987, 2 73-82

12. Gutiérrez G. Investigaciones mexicanas sobre vacunas. Amebiasis. *Epidemiologia* 1987; 2: 125-129.
13. Escandón-Romero C, Treviño-García MN, Escobedo de la Peña J, Hernández-Ramos JM, Olvera-Alvarez J, Cabral-Soto J. La amebiasis y el absceso hepático amebiano en México, un problema de salud pública de actualidad. *Rev Gastroenterol Méx* 1996; 61: 378-386.
14. Tay J, De-Haro I, Romero-Caballero R, Alonso-Guerrero T, Cisneros-Sánchez M, Ruiz-Hernández A, Sánchez-Vega JT. Parasitosis intestinal en comunidades con diferente disponibilidad de servicios de drenaje. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría* 1993; 6: 55-58.
15. Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of personal and domestic hygiene. *Bull WHO* 1984; 62: 467-476.
16. Shuval HI, Tilden RL, Perry BH, Grosse RN. Effect of investments in water supply and sanitation on health status: a threshold-saturation theory. *Bull WHO* 1981; 59: 243-248.
17. Esrey SA, Feachem RG, Hughes JM. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. *Bull WHO* 1985; 63: 757-772.
18. Sánchez VJT, Romero-Caballero R, Daujare CS, Ramirez-Ramos M. Contaminación biológica del agua de consumo de una comunidad del Distrito Federal. *Salud Pùb Méx* 1980; 22: 275-280.
19. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutiérrez G, Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 412-419.
20. Gutiérrez G, Ludlow A, Espinoza G, Herrera S, Muñoz O, Rattóni N, Sepúlveda B. National serologic survey. II. Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico. En: *Proceedings of the international conference on amebiasis*. Sepúlveda B, Diamond LS (eds.) IMSS. Inc. Mexico, 1976: 609-618.

21. Martínez-Palomo A, González RA, De la Torre M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Concanavalin A. *Nature New Biol* 1973; 245: 186-190.
22. Tsutsumi V, Ramirez-Rosales A, Lanz-Mendoza H, Shibayama M, Chavez-B, Rangel-López E, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: eритрофагоцитоз, коллагенолиз и образование абсцессов печени как маркеры вирулентности. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 86: 170-172.
23. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-525.
24. Sargeant PG. Zimodemes of *Entamoeba histolytica*. En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. Ravdin JI (Ed) John Wiley and Sons Inc. New York, 1988: 370-421.
25. Diamond LS, Graham C. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903. Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925. *J Euk Microbiol* 1993; 40: 340-344.
26. Graham CC, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of "nonpathogenic" amebae to the "pathogenic" form. *Experimental Parasitology* 1993; 77: 456-460.
27. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5118-5122.
28. Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takeuchi T, Watanabe Y. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2234-2239.
29. Vinayak VK. Wich amoeba are harmful? *Ind J Pediat Annotations* 1985; 52: 452-454.
30. Jackson TFG, Gathram V, Suparsad S, Anderson CA. Stability of the zimodemes of *Entamoeba histolytica* in culture. *Arch Med Res* 1992; 23: 71.

31. Carrero JC, Laclette JP. Molecular Biology of *Entamoeba histolytica*: A review. Arch Med Res 1996; 27: 403-412.
32. Samuelson J, Acuna-Soto R, Reed S, Biagi F, Wirth D. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 1989; 27: 671-676.
33. Acuna-Soto R, Samuelson J, De-Girolami P, Zárate L, Millán VF, Schoolnick G, Wirth D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 58-70.
34. Romero JL, Descoteaux S, Reed S, Orozco E, Santos J, Samuelson J. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *E. histolytica* in clinical samples. Arch Med Res 1992; 23: 277-279.
35. Garfinkel LI, Giladi M, Huber M, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. Infect Immun 1989; 57: 926-931.
36. Gutiérrez G, Muñoz O. Epidemiology of amebiasis. En: Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Kretschmer RR (Ed.) CRS Press Inc. Florida, 1990: 173-189.
37. Gómez-Delgado A, Martínez-García MC, Garduño-Espinosa J, Garduño-Rodríguez G, Valadez-Salazar A, Muñoz O. Historia natural de la infección amebiana durante el primer año de vida. Estudio comparativo de cohortes. Bol Med Hosp Infant Méx 1995; 52: 203-211.
38. Oyerinde JPO, Alonge AA, Adegbite-Holist AF, Oguribi O. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a Nigerian urban population. Int J Epidemiol 1979; 8: 55-59.
39. Ravdin JI. Pathogenesis of amebiasis: An overview. En: Amebiasis. Human Infection by *E. histolytica*. Ravdin JI (Ed.) John Wiley and sons Inc. New York, 1988: 166-176.
40. Pérez-Tamayo R, Becker I, Montfort I, Pérez MR. Pathobiology of amebiasis. En: Amebiasis. Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Kretschmer RR (Ed.) CRS Press Inc. Florida: 1990: 123-157.

- 41 Walsh JA. Transmission of *entamoeba histolytica* infection. En Amebiasis Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Ravdin JI (Ed.) John Wiley and Sons Inc New York, 1988 106-126.
- 42 Nanda R, Anand BS, Baveja V. *Entamoeba histolytica* cyst passers. Clinical features and outcome in untreated subjects. Lancet 1984, 2. 301-303
- 43 Ravdin JI. Leading article-Tropical infection of the gastrointestinal tract and liver series. Gut 1994; 35 1018-1021
- 44 Gathiram V, Jackson TFHG. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *entamoeba histolytica*. S Afr Med J 1987, 72 669-672
- 45 Ruiz-Palacios GM, Castañón G, Bojalil R, Tercero E, Rausser S, Herbert L, Agabian N, Martínez-Palomo. Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study. Arch Med Res 1992; 23 289-291
- 46 Weber G, Mohr W, Fleischer K, Sargeant PG. *Entamoeba histolytica* infections in flight personnel of an international airline. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990, 84 803-805
- 47 Arellano J, Granados J, Frenk P, López-Osuna M, Santos I, Kretschmer RR. Increased frequency of HLA-DR3 in mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). Arch Invest Med (Méx.) 1992, 23 269-275
- 48 Arellano J, Pérez-Rodríguez M, López-Osuna M, Velázquez RJ, Granados J, Justiniani N, Santos JI, Madrazo A, Kretschmer R. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver. Parasite Immunology 1996, 18: 491-498
- 49 Diamond LS, Harlow DR, Phillips BP, Keister DB. *Entamoeba histolytica*: iron and nutritional immunity. Arch Invest Med (Méx.) 1978, 9 (suppl.) 329-338.
- 50 Treviño-García MN. Clinical spectrum of amebiasis in adults. In Kretschmer RR. Ed. Amebiasis. Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Florida: CRS Press Inc 1990 191-208
- 51 Armon PJ. Amebiasis in pregnancy and the puerperium. Br J Obstet Gynaecol 1978 85 264-268

52. Petri WA, Clark GC, Diamond LS. Host-parasite relationships in amebiasis: conference report. *J Infect Dis* 1994; 169: 483-484.
53. Ghosh PK, Mancilla R, Ortiz-Ortiz L. Intestinal amebiasis: histopathologic features in experimentally infected mice. *Arch Med Res* 1994; 25: 297-302.
54. Yi-Yu, Chadee Kris. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 1997; 112: 1536-1547.
55. 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: 1305-1313.
56. Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980; 152: 377-390.
57. Trissl D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal host. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 1154-1184.
58. Jackson TFHG, Gathiram V, Simjee AE. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1985; 30: 716-719.
59. Mestecky J, Mc Ghee JR, Arnold RR, Michalek SM, Prince SJ, Babb JL. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *J Clin Invest* 1978; 61: 731-737.
60. Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell NW, Moldoveanu Mc-Ghee JR, Mestecky J. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence of a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2449-2453.
61. Vega-López M. Actualidades en el estudio de la inmunología local y su aplicación en parasitosis. *Gac Med Méx* 1996; 132: 507-513.
62. Mc Ghee JR, Mestecky J, Mark T, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccines development. *Vaccine* 1992; 10: 75-88.

63. Hanson LA, Ahlstedt S, Carlsson B, Jodal U, Lindberg U, Sohl A. Studies of secretory antibodies to *E. coli* in human urine compared to the serum antibody content. *Adv Exp Med Biol* 1974; 45: 399-408.
64. Escandón-Romero C. Detection of anti-*E. histolytica* IgA salivary antibodies. Evaluation of its diagnostic capability in a rural setting. *Arch Med Res* 1997; 28, suppl. 306-308.
65. Isibasi A, Kumate J. Antigenos. En: Kretschmer RR, de. *Amibiasis. Infección y enfermedad por E. histolytica*. México: Trillas, Inc, 1994. 85-101.
66. Ximénez GC, Hernández YJ, Melendro LE, Ranuro HM. Coproanticuerpos y anticuerpos séricos antiambianos en la amibiasis intestinal aguda. *Arch Invest Med (Méx.)* 1990; 21(supl 1): 239-243.
67. Gonzalo-Gutiérrez G, Muñoz O. Epidemiology of amebiasis. En: *Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica*. Kretschmer RR (Ed) CRS Press Inc. Florida, 1990. 173-189.
68. Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 727-732.
69. Mohammed D, ABD-ALLA, Ahmed M, El-Hawey, Ravdin JI. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-adherence protein antibodies in sera of patients with invasive amebiasis in Cairo, Egypt. *A. J Trop Med Hyg* 1992; 47: 800-804.
70. Ximénez C, Leyva O, Morán P, Ramos F, Melendro EI. *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Annals of Trop Med Parasitol* 1993; 87: 31-39.
71. Edman V, Meraz MA, Rauser S, Agabian N, Meza I. Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *E. histolytica*. *J Exptl Med* 1990; 172: 879-888.
72. Stanley SI Jr, Jackson TFHG, Reed SL, Calderon J, Jenking CK, Gathiram V, Li-Ellen. Serodiagnosis of invasive using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA* 1991; 266. 1984-1986.

- 73 Myung K, Burch D, Jackson TFHG, Stanley SI JR. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *E. histolytica* antigen-based ELISA. Arch Med Res 1992, 23: 285-288.
- 74 Lotter H, Mannweiler E, Schreiber M, Tannich E. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant *E. histolytica* antigen protein. J Clin Microbiol 1992; 30: 3163-3167.
- 75 Lotter H, Jackson TFHG, Tannich E. Evaluation of three serological test for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. Trop Med Parasitol 1995, 46: 180-182.
- 76 Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. Map of the human MHC. Immunol today 1991; 12: 443-446.
- 77 So Alex. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In: Lechler R. HLA and disease. USA: Academic Press Inc, 1994. 1-34.
- 78 Bodmer JG, Marsh SGE, Bodmer WF, Albert ED, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factors of the HLA system 1991. Tissue Antigens 1992, 39: 161-173.
- 79 Madden DR. The three dimensional structure of peptide-MHC complexes. Annu Rev Immunol 1995, 13: 587-622.
- 80 Tiwari J, Terasaki PI. HLA and disease associations. Springer Verlag Inc. New York, 1985.
- 81 Wakelin D, Donachie AM. Genetic control of immunity to *trichinella spiralis*. influence of H-2 linked genes on immunity to the intestinal phase of infection. Immunol 1983, 48: 343-350.
- 82 Hill AVS, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S. Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature 1991; 352: 595-600.
- 83 Hill AVS, Elvin J, Willkis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gho XM, Takiguchi M. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. Nature 1992, 360: 434-439.

84. Dieye A, Sarthou JL, Balde-Toure A, Aribot G, Roussillon C, Rogier C, Trape JF, Heidrich HG. Analysis of the antibody response to merozoite antigens in a malaria holoendemic area. *Abstract Dakar Med* 1993; 38: 169.
85. Powel MR, Wassom DL. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: antibody isotype profiles. *Parasite Immunol* 1993; 15: 215-221.
86. Blackwell JM, Roberts CW, Alexander J. Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in balb H-2 congenic mice. *Parasite Immunol* 1993; 15: 317-324.
87. Howard JG, Hale C, Chan-Liew WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis: Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol* 1980; 2: 303-314.
88. Venkatesan P, Finch RG, Wakelin D. MHC haplotype influences primary *Giardia muris* infections in H-2 congenic strains of mice. *Inter J Parasit* 1993; 23: 661.
89. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43: 18-27.
90. Lechler R. Mechanisms of HLA and disease associations. En: *HLA and disease* Lechler R (Ed.) Academic Press Inc USA 1994: 83-91.
91. Heard R. HLA and autoimmune disease. In: Lechler R (Ed.) *HLA and disease*. USA: Academic Press Inc, 1994: 123-151.
92. Anderson M, Paabo S, Nilsson T. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* 1985; 43: 215-222.
93. Ghadirian E, Kongshavn PAL. Genetic control of susceptibility of mice to infection with *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunology* 1984; 6: 349-360.
94. Bronfman M, Guiscafré H, Castro V, Castro R, Gutierrez G. La medición de la desigualdad: Una estrategia metodológica: análisis de las características socioeconómicas de la muestra. *Arch Invest Med (Mex)* 1988; 19: 351-360.

- 95 Garcia-Lynnes Macroscopic and microscopic examination of fecal specimens. En Diagnostic Medical Parasitology Garcia-Lynne (Ed) A S.M. Inc. USA, 1983 506-510
- 96 Fleiss JL Determining sample sizes needed to detect a difference between two proportion. En Statistical Methods for Rates and Proportions Fleiss (Ed) Wiley and Sons Inc. New York, 1981 38-52
- 97 Gorodezky C, Terán L, Gutiérrez-Escobar A. HLA frequencies in a mestizo mexicano population. Tissue Antigens 1979; 14 347-352
- 98 Martinez-Garcia MC, Muñoz O, Peniche A, Ramirez GE, Gutiérrez G. Epidemiology of acute diarrhoea in a rural medical care system in México. Arch Invest Méd (Méx) 1989; 20 69-78
- 99 Sackett DL. Compliance by patients. En Clinical Epidemiology. A basic science for clinical medicine Sackett DL (ed) Little Brown Inc. New York, 1991 249-261
- 100 Terasaky P, Bernoco D, Ozturk G, Iwaki Y. Microdotlet testing for HLA-A, B, C, and D antigens. (The Phillip Levine Award Lecture) Am J Clin Path 1978, 69 103-117
- 101 Dyer P, Warrens A. Desing and interpretation of studies the major histocompatibility complex in disease. In: Lechler R. Ed. HLA and disease. USA. Academic Press. Inc, 1994 93-121
- 102 Graham CC, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "non pathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. Biochem Parasitol 1991; 49 297-302
- 103 Fajardo GA, Tatsuko KT, Garduño EJ, Hernández HD, Martínez GC. Consistencia y validez de una medición en la investigación clínica pediátrica. Definición, evaluación y su interpretación. Bol Méd Hosp Infant Méx 1991, 48: 367-381.
104. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. Measures of potential impact and summary of the measures. En Epidemiological Research Principles and Quantitative Methods Kleinbaum DG (Ed) Van Nostrand Reinhold Inc. New York, 1982 159-180
- 105 Dawson SB, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. Appleton and Lange Norwalk-Connecticut USA, 1994

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

106. Concato J, Feinstein AR, Holford TR. Analyzing multiple variables. En: How to report statistics in medicine. Lang T, Secic M (Eds.) Medical Writing and communication Inc. Philadelphia, 1997. 105-125
107. Muñoz O. Epidemiology of amebiasis. En: Amebiasis. Martínez-Palomo A (ed) Biomedical Division Inc. Amsterdam, 1986. 213-239
108. Lara-Aguilera R, Aguilar Bucio MT, Martínez-Toledo JL. Teniasis, amebiasis y otras parasitosis intestinales en niños de edad escolar del estado de Michoacán, México. Bol Hosp Infant Méx. 1990; 47: 153-159
109. Hiatt AR, Markell EK, Ernest NG. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa?. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53: 36-39
110. Gonzalez-Ruiz A. Revisión del estado actual del diagnóstico diferencial de las amebas en México. Salud Pùb Méx. 1990; 32: 589-596.
111. Gutiérrez T. El agua en el control de las infecciones. Bol Acad Nac Med (Méx.) 1997; 6: 7.
112. Ravdin IJ. State of the art clinical article. Clin Infect Dis. 1995; 20: 1453-1466
113. Serafín F, Castañeda E, Díaz S, Palacios O, Gutiérrez G. Evaluación diagnóstica y terapéutica en la amebiasis intestinal invasora del niño. Arch Invest Méd (Méx.) 1980; 11 (supl. 1): 291-294
114. Jetter A, Walderich B, Britten D, Mete O, Goral V, Burchard GD, Ackers J. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* infection in east Turkey using colorimetric polymerase chain reaction. Arch Med Res. 1997; 28 (supl 1): 319-321
115. Bruchhaus I, Brattig NW, Tannich E. Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1992; 23: 27-29
116. Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lysterly DM, Petri WA. *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. Infection in Children in Bangladesh. J Infect Dis. 1997; 175: 734-736

- 117 Moshadeque HM, Ljungstrom Y, Glass RI, Lundin L, Stoll BJ, Hultdt G. Amoebiasis and giardiasis in Bangladesh parasitological and serological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 552-554.
- 118 Heyworth MF. Biological significance of giardia specific antibodies. *West J Med* 1990; 152: 293-295.
- 119 Moreno-Fierros L, Dominguez-Robles MC, Enriquez-Rincón F. The use of an ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered *Entamoeba histolytica* antigen in mice. *Arch Med Res* 1994; 25: 183-187.
- 120 Wang W, Chadee K. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon induced macrophage class II Major Histocompatibility Complex (Ia) molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun* 1995; 63: 1089-1094.
- 121 Vargas-Alarcón G, Alvarez M, Martínez Laso J, Granados J, Díaz-Campos N, Gómez-Casado E, Alcocer-Varela J, Amaiz-Villena A. A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a mexican of nahua (aztec) descent. *Immunogenetics* 1996; 43: 244-245.

**CUADRO 1
DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

CARACTERÍSTICAS	PORTADORES N=52		CONTROLES n=53		OR (I.C. 95%)	p
	n	%	n	%		
EDAD (N (D.S.))	39.8 ± 14.1		40.3 ± 14.1			0.39 ⁽¹⁾
SEXO FEMENINO	42	81	43	81	1.02 (0.4- 3.0)	0.96 ⁽²⁾
ESCOLARIDAD (primaria o menos)	29	55.8	30	56.6	0.97 (0.4-2.3)	0.93 ⁽²⁾
AMAS DE CASA	16	31	19	36	0.80 (0.3-1.9)	0.58 ⁽²⁾
MALAS CONDICIONES DE LA VIVIENDA	6	11.5	3	5.7	2.17 (0.5-11.8)	0.28 ⁽³⁾
BAJO NIVEL SOCIOECONOMICO	13	25	11	21	1.27 (0.5-3.5)	0.61 ⁽²⁾
MALA HIGIENE	33	64	26	49	0.80 (0.8-4.3)	0.14 ⁽²⁾

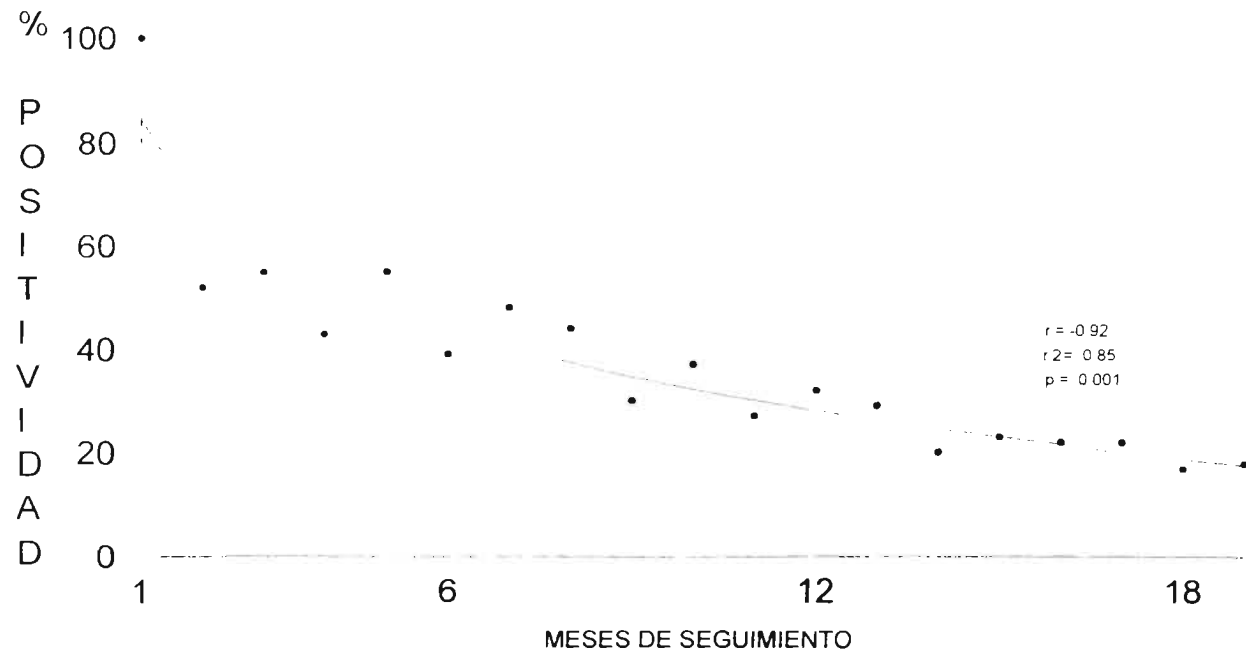
(1) t-Student (2) χ^2 (3) pba. exacta de Fisher
 OR = Razón de momios IC = Intervalos de confianza D.S. = Desviación estándar

Cuadro 2. Características asociadas al estado de portador asintomático de *E. histolytica*/*E. dispar*

Variable	Coefficiente β	Error estándar	Wald χ^2	p	OR	I.C. 95%
Agua potable extradomiciliaria	1.3358	0.6097	4.80	0.03	3.80	1.15 - 12.56
No lavado de manos después de ir al baño	1.4607	0.6888	4.50	0.03	4.30	1.12 - 16.62
Escolaridad:			10.28	0.02		
nula	-0.9733	0.7131	1.86	0.17	0.38	0.09 - 1.53
de 02 a 06 años	-1.5412	0.6417	5.77	0.02	0.21	0.06 - 0.75
de 07 a 10 años	-2.1987	0.7214	9.29	0.00	0.11	0.03 - 0.46

Resultado del análisis de regresión logística donde se incluyeron además las siguientes variables: excretas, ocupación, hábitos higiénicos de las manos (antes de comer y antes de preparar alimentos), alimentación en vía pública, e ingesta de agua hervida

FIGURA 1.
EVOLUCIÓN DEL ESTADO DE PORTADOR DE *E. histolytica* / *E. dispar*



**CUADRO 3
INCIDENCIA DE DIARREAS DURANTE EL SEGUIMIENTO**

EPISODIOS DE DIARREA									
Sujetos de Estudio	Sujetos con diarrea/Total de individuos	%	Número Episodios/Total de individuos	Promedio por individuo	Número de episodios/ Meses-persona	**D.I.		*p	Diarrea c/Sangre
Casos	15/52	28.8	15/52	0.29	15/624	0.02			No
Controles	17/53	32.1	18/53	0.34	18/624	0.03	RR= 0.92 (IC 95% 0.60-1.43)	0.72	No

*N² ** Densidad de incidencia

Figura 2. Valores de anticuerpos IgA sérica anti-*E. histolytica* en portadores y controles

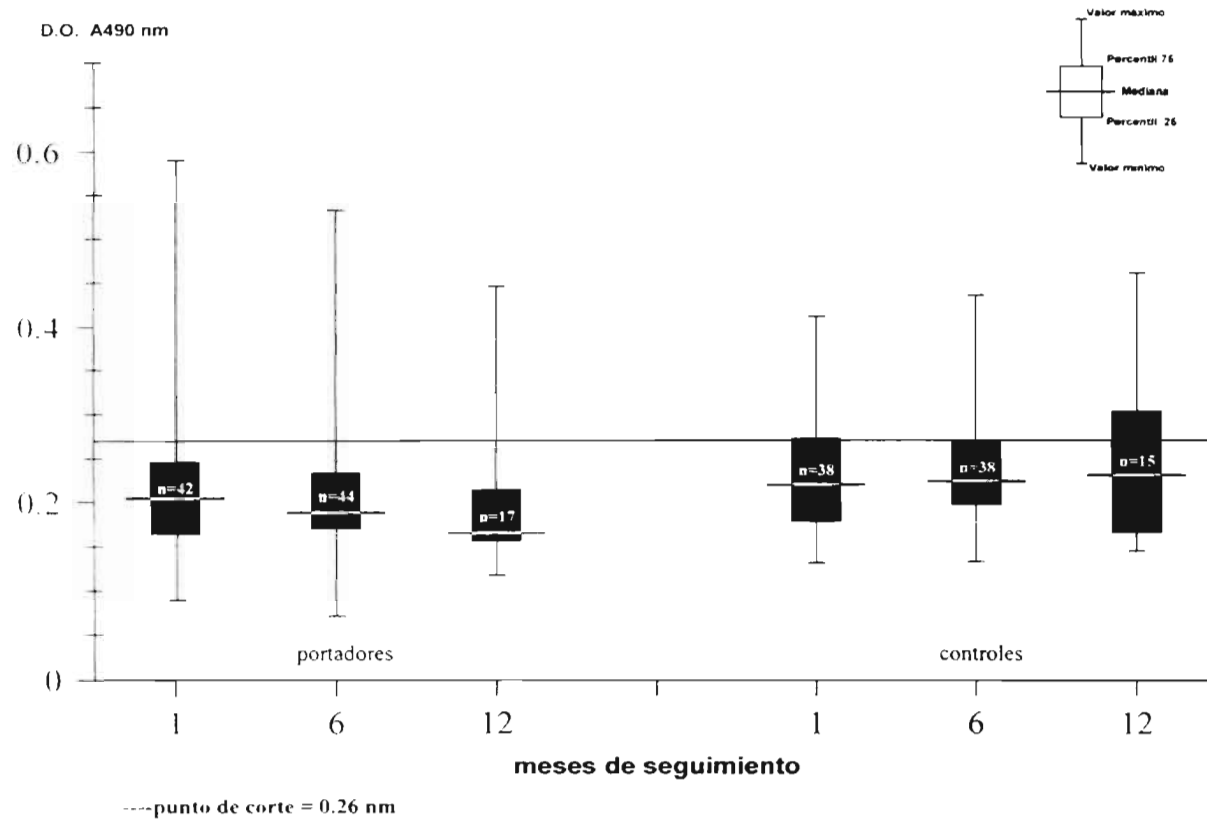


Figura 3. Valores de anticuerpos IgG anti-*E. histolytica* en portadores y controles

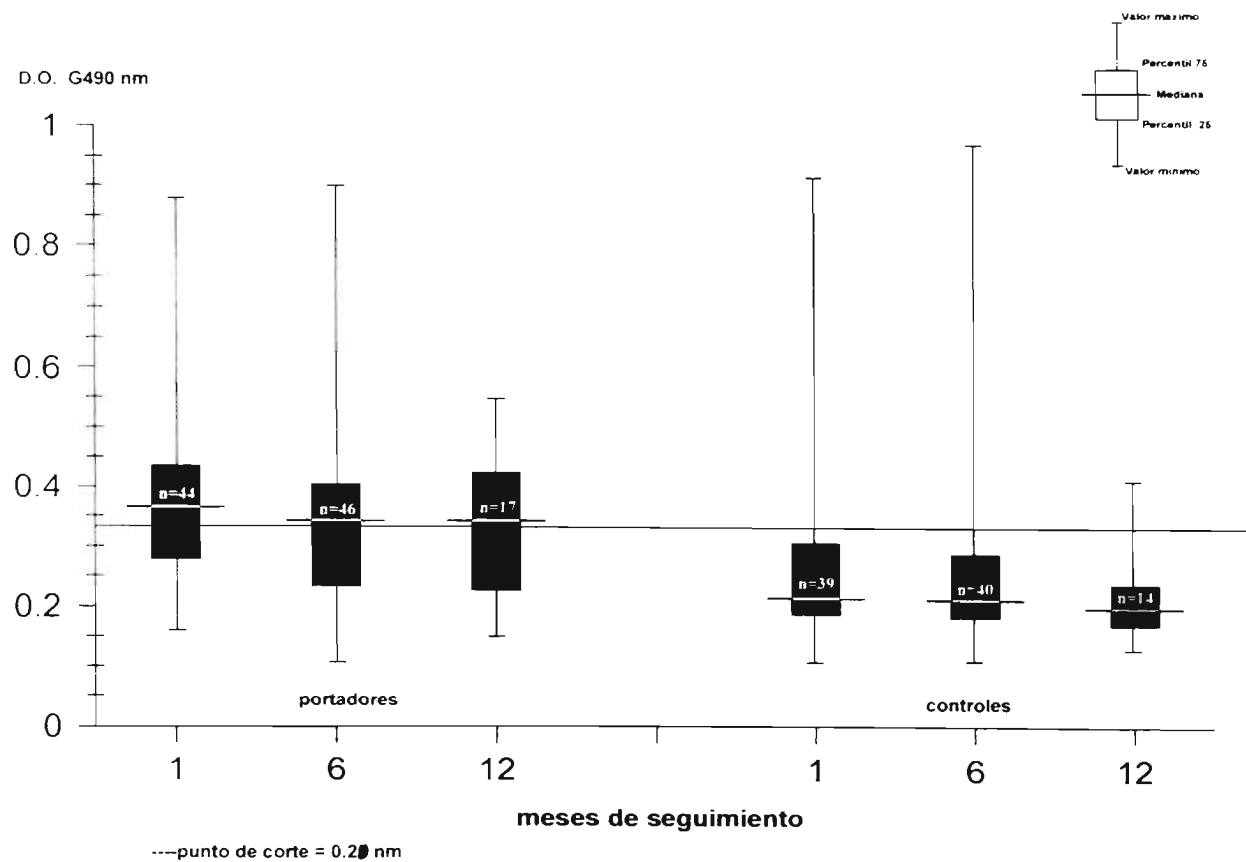
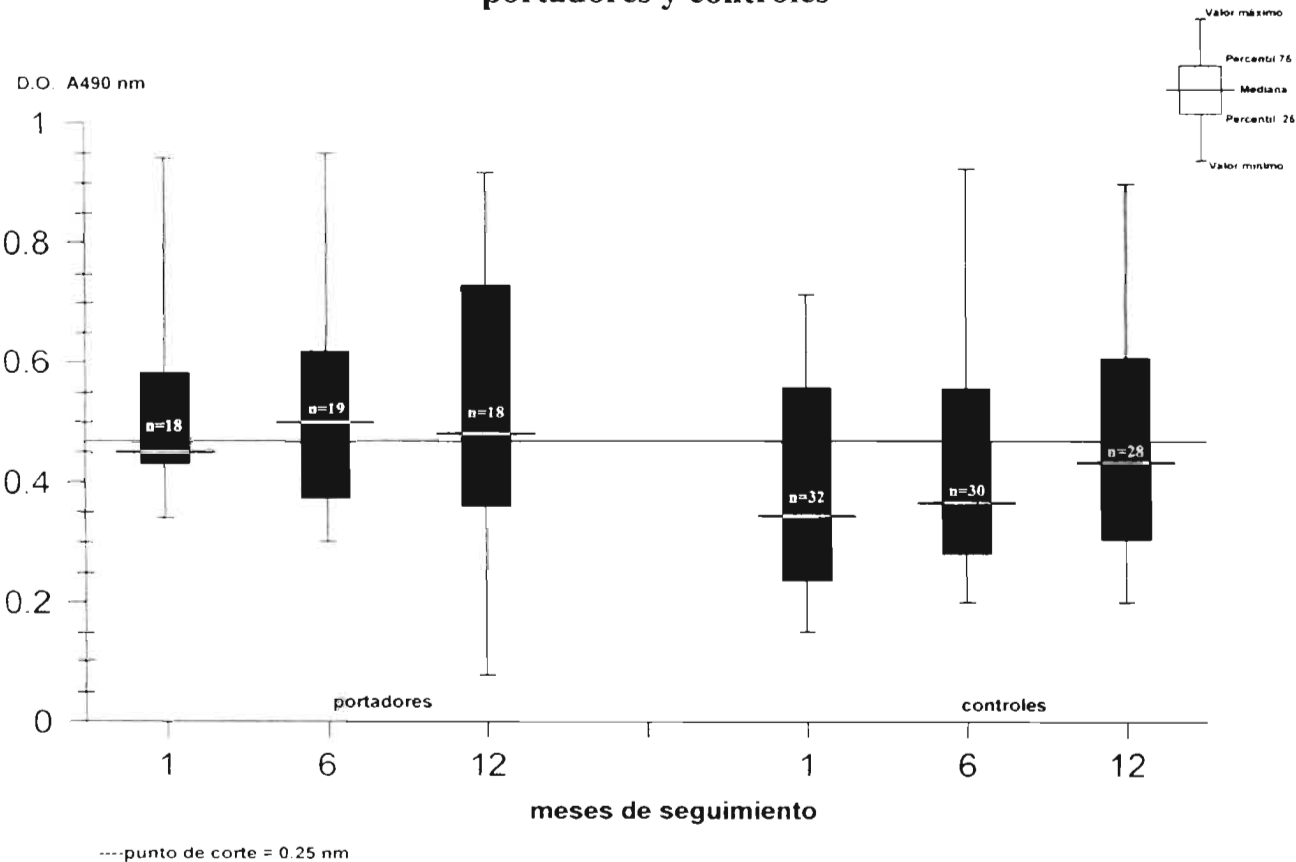


Figura 4. Valores de anticuerpos IgA en saliva anti-*E. histolytica* en portadores y controles



CUADRO 4
FRECUENCIA DE ANTÍGENOS HLA CLASE I, LOCUS A.
POR GRUPOS DE REACCIÓN CRUZADA EN PORTADORES
Y NO PORTADORES DE *E. histolytica* / *E. dispar*

Antígenos	CASOS (n=52)		CONTROLES (n=53)	
	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
A2	59.6	36.4	58.5	35.6
A28	32.7	18	26.4	14.2
A19 ⊙	30.8	16.8	35.8	19.9
A9 ⊕	28.8	15.6	22.6	12
A3	17.3	9.1	5.7	3
A1	11.5	6	11.3	6
A10 ♦	1.9	0.95	9.4	5
A11	0	0	11.3	6
A-BCO	19.2	10	17	9

Las frecuencias antigénicas y génicas se expresan en porcentaje
A-BCO significa alelo no detectado
⊙ A19 = A29 + A31 + A32 + A33 + A74
⊕ A9 = A23 + A24
♦ A10 = A25 + A26

CUADRO 5
FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA CLASE I, LOCUS B,
POR GRUPOS DE REACCIÓN CRUZADA EN PORTADORES
Y NO PORTADORES DE *E. histolytica*/*E. dispar*

Antígenos	CASOS (n=52)		CONTROLES (n=53)	
	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
B35	32.7	18	24.5	13.1
B15 ⁽¹⁾	30.8	16.8	17	9
B16 ⁽²⁾	28.8	15.6	45.3	26
B5 ⁽³⁾	26.9	14.5	17	9
B14	11.5	5.9	1.9	0.96
B12 ⁽⁴⁾	9.6	4.9	15.1	7.9
B40 ⁽⁵⁾	9.6	4.9	11.3	5.8
B7	7.7	3.9	7.5	3.8
B18	5.8	2.9	11.3	5.8
B21 ⁽⁶⁾	5.8	2.9	3.8	1.9
B48	5.8	2.9	9.4	5
B17 ⁽⁷⁾	3.8	1.9	1.9	0.96
B27	3.8	1.9	1.9	0.96
B70	3.8	1.9	1.9	0.96
B8	3.8	1.9	5.7	2.9
B37	1.9	0.95	0	0
B41	0	0	1.9	0.96
B53	0	0	3.8	1.9
B55	0	0	1.9	0.96
B56	0	0	1.9	0.96
B-BCO	9.6	4.9	11.3	5.8

Las frecuencias antigénicas y génicas se expresan en porcentaje

B-BCO significa: alelo no detectado

⁽¹⁾ B15 = B32 + B75

⁽²⁾ B16 = B38 + B59

⁽³⁾ B5 = B31 + B52

⁽⁴⁾ B12 = B44 + B45

⁽⁵⁾ B40 = B60 + B61

⁽⁶⁾ B21 = B49 + B50

⁽⁷⁾ B17 = B57 + B58

CUADRO 6
 FRECUENCIA DE ANTÍGENOS HLA CLASE II, POR
 GRUPOS DE REACCIÓN CRUZADA EN PORTADORES Y
 NO PORTADORES DE *E. histolytica*/*E. dispar*.

Antígenos	CASOS n = 52		CONTROLES n = 53	
	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica	Frecuencia antigénica	Frecuencia génica
DR4	46.2	26.7	62.3	38.6
DR8	38.5	21.6	24.5	13.1
DR6 ⁽¹⁾	25.0	13.4	32.1	17.6
DR5 ⁽²⁾	23.1	12.3	18.9	9.9
DR1	19.2	10	7.5	3.8
DR2 ⁽³⁾	17.3	9.1	17	9
DR7	13.5	7	9.4	5
DR3 ⁽⁴⁾	9.6	4.9	9.4	5
DR10	1.9	0.95	1.9	0.96
DR9	1.9	0.95	13.2	6.8
DR-BCO	3.8	1.9	5.7	2.9
DQ3 ♦	92.3	72.3	96.2	80.5
DQ1 ∅	44.2	25.3	35.8	20
DQ4	30.8	16.8	30.2	16.5
DQ2	23.1	12.3	18.9	9.9
DQ-BCO	7.7	3.9	17	9

Las frecuencias antigénicas y génicas se expresan en porcentaje.
 DR-BCO y DQ-BCO significa ausencia de alelos correspondientes.

(1) DR6 = DR13 + DR14

(2) DR5 = DR11 + DR12

(3) DR2 = DR15 + DR16

(4) DR3 = DR17 + DR18

∅ DQ1 = DQ5 + DQ6

♦ DQ3 = DQ7 + DQ8 + DQ9

CUADRO 7
 FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS DEL LOCUS A, ENTRE PORTADORES Y
 NO PORTADORES DE *E. histolytica* - *E. dispar*

Antígenos	Casos (n=52)		Controles (n=53)		p*	pC
	n	%	n	%		
A2	31	59.6	31	58.5	1	NS
A28	17	32.7	14	26.4	0.48	NS
A24	10	19.2	9	17	0.76	NS
A3	9	17.3	3	5.7	0.06	NS
A1	6	11.5	6	11.3	1	NS
A29	5	9.6	2	3.8	0.27	NS
A23	4	7.7	0	0	0.57	NS
A31	4	7.7	7	13.2	0.36	NS
A33	3	5.8	0	0	0.12	NS
A30	2	3.8	8	15.1	0.09	NS
A74	1	1.9	0	0	0.49	NS
A19	1	1.9	1	1.9	1	NS
A9	1	1.9	3	5.7	0.62	NS
A26	1	1.9	4	7.5	0.18	NS
A25	0	0	1	1.9	1	NS
A11	0	0	6	11.3	0.03	NS
A32	0	0	1	1.9	1	NS
A-BCO	10	19.2	9	17	0.76	NS

p* = producto de χ^2 o prueba exacta de Fisher
 A-BCO significa que no detectado

pC = p corregida

CUADRO 8
FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS DEL LOCUS B ENTRE PORTADORES
Y NO PORTADORES DE *E. histolytica* / *E. dispar*

Antígenos	Casos (n=52)		Controles (n=53)		p*	pC
	n	%	n	%		
B35	17	32.7	14	26.4	0.48	NS
B62	14	26.9	8	15.1	0.14	NS
B39	12	23.1	17	32.1	0.30	NS
B51	9	17.3	5	9.4	0.24	NS
B14	6	11.5	1	1.9	0.05	NS
B7	4	7.7	4	7.5	1	NS
B18	3	5.8	6	11.3	0.49	NS
B44	3	5.8	7	13.2	0.32	NS
B48	3	5.8	5	9.4	0.72	NS
B49	3	5.8	0	0	0.12	NS
B52	3	5.8	4	7.5	1.0	NS
B60	3	5.8	3	5.8	1	NS
B27	2	3.8	1	1.9	0.62	NS
B38	2	3.8	3	5.7	1.0	NS
B5	2	3.8	0	0	0.24	NS
B70	2	3.8	1	1.9	0.62	NS
B8	2	3.8	3	5.8	1	NS
B12	1	1.9	0	0	0.49	NS
B15	1	1.9	1	1.9	1	NS
B16	1	1.9	4	7.5	0.36	NS
B17	1	1.9	0	0	0.49	NS
B37	1	1.9	0	0	0.49	NS
B40	1	1.9	2	3.8	1.0	NS
B45	1	1.9	1	1.9	1	NS
B57	1	1.9	0	0	0.49	NS
B61	1	1.9	1	1.9	1	NS
B75	1	1.9	0	0	0.49	NS
B21	0	0	1	1.9	1	NS
B41	0	0	1	1.9	1	NS
B50	0	0	1	1.9	1	NS
B53	0	0	2	3.8	0.49	NS
B55	0	0	1	1.9	1	NS
B56	0	0	1	1.9	1	NS
B58	0	0	1	1.9	1	NS
B-BCD	5	9.6	6	11.3	0.78	NS

p* = producto de χ^2 o prueba exacta de Fisher
 B-BCD: signo estadístico

pC = p corregida

CUADRO 9
 FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS DE LOS LOCUS DR y DQ ENTRE PORTADORES
 Y NO PORTADORES DE *E. histolytica* / *E. dispar*

Antígenos	Casos (n=52)		Controles (n=53)		p*	pC
	n	%	n	%		
DR52	37	71.2	43	81.1	0.23	NS
DR53	36	69.2	41	77.4	0.34	NS
DR4	24	46.2	33	62.3	0.10	NS
DR8	20	38.5	13	24.5	0.12	NS
DR1	10	19.2	4	7.5	0.08	NS
DR13	10	19.2	15	28.3	0.28	NS
DR7	7	13.5	5	9.4	0.52	NS
DR11	7	13.5	5	9.4	0.52	NS
DR15	6	11.5	3	5.8	0.32	NS
DR5	3	5.8	0	0	0.12	NS
DR17	3	5.8	5	9.4	0.72	NS
DR14	3	5.8	2	3.8	0.68	NS
DR3	2	3.8	0	0	0.24	NS
DR12	2	3.8	5	9.4	0.44	NS
DR16	2	3.8	4	7.5	0.68	NS
DR9	1	1.9	7	13.2	0.06	NS
DR10	1	1.9	1	1.9	1	NS
DR2	1	1.9	2	3.8	1	NS
DR-BCO	2	3.8	3	5.8	0.68	NS
DQ7	26	50	35	66	0.10	NS
DQ4	16	30.8	16	30.2	1	NS
DQ5	16	30.8	7	13.2	0.03	NS
DQ8	14	26.9	12	22.6	0.61	NS
DQ1	12	23.1	10	18.9	0.60	NS
DQ6	6	11.5	11	20.8	0.20	NS
DQ3	4	7.7	2	3.8	0.44	NS
DQ9	4	7.7	2	3.8	0.44	NS
DQ-BCO	4	7.7	9	17	0.15	NS

* p = probabilidad de χ^2 (prueba exacta de Fisher)
 DR-BCO = DQ-BCO: significan si los no detectados

pC = p < 0.05

CUADRO 10
FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS HLA CLASE III

ANTIGENOS		CASOS (n=52)		CONTROLES (n=53)		p*
		n	gf %	n	gf %	
FB	1	17	16.3	19	17.9	0.85
	5	87	83.7	87	82.1	0.72
C2	C	104	100	106	100	-
C4A	0	18	17.3	11	10.4	0.21
	1	2	1.9	3	2.8	1
	2	6	5.8	2	1.9	0.28
	3	75	72.1	84	79.2	0.32
	4	3	2.9	6	5.7	0.50
C4B	0	9	8.7	7	8.5	0.80
	1	88	84.6	87	82.1	0.70
	2	4	3.8	9	8.5	0.25
	3	1	0.9	1	0.9	0.62

p* = al producto de χ^2 Cuadrado o prueba exacta de Fisher
gf = frecuencia genotípica

CUADRO 11
 FRECUENCIAS DE COMPLETIPOPOS ENTRE PORTADORES Y
 NO PORTADORES DE *E. histolytica* / *E. dispar*

Antígenos	Casos (n=52)		Controles (n=53)		p*
	n	%	n	%	
FC31	10	19.2	15	28.3	0.18
FC01	1	1.9	0	0	0.50
FC41	1	1.9	0	0	0.50
FC42	0	0	1	1.9	0.50
SC31	20	38.5	24	45.3	0.47
SC01	14	26.9	11	20.8	0.41
SC30	6	11.5	7	13.2	1
SC21	4	7.7	2	3.8	0.37
SC42	1	1.9	4	7.5	0.10
SC11	1	1.9	2	3.8	0.68
SC12	1	1.9	0	0	1
SC20	1	1.9	0	0	1
SC33	1	1.9	0	0	1

p* = χ^2 producto de ji cuadrado o prueba exacta de Fisher
 ff = frecuencia antigénica