



11262
23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**DIFERENCIACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS DE NO
PATÓGENAS DE *Entamoeba histolytica* POR MEDIO DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
DIRECTAMENTE DE MATERIA FECAL.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS, P R E S E N T A
ALUMNO: OSCAR ALBERTO NEWTON SÁNCHEZ
DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ IGNACIO SANTOS**

MÉXICO, D.F., MAYO DEL 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
DR. BALMIS No. 148, COL. DOCTORES,
06726, MEXICO, D.F.

**DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRÍAS Y DOCTORADOS MÉDICOS,
ODONTOLÓGICOS Y DE LA SALUD
P R E S E N T E**

Por medio de la presente el alumno Oscar Alberto Newton Sánchez inscrito en el Programa de Maestría en Ciencias Médicas, adscrito a la Unidad Operativa Centro, la tesis titulada "Diferenciación de cepas patógenas de no patógenas de *Entamoeba histolytica* por medio de reacción en cadena de la polimerasa directamente de materia fecal", reúne la originalidad y calidad suficiente para ser sometida a la consideración de jurado de examen de grado correspondiente.

**Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., 21 de mayo del 2002.**

**DR. JOSE IGNACIO SANTOS
PROFESOR TITULAR "C"
TUTOR**

JIS/aajb**

AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar agradecimientos por escrito a todas aquellas personas que por su influencia han dejado huella en ti; habitualmente omitimos a muchas buenas personas que merecen que les demos las gracias, a todos aquellos que no mencione, en mi corazón siempre estarán. Cuando un alumno termina un trabajo y requiere presentar un documento, el punto más complicado es lograr expresar por escrito el verdadero agradecimiento que sentimos por aquellos que ayudaron a cumplir el objetivo.

Cuando las personas cercanas te enseñan el camino por el cual debes de caminar a través de la vida, cuando te apoyan a pesar de equivocarte en forma continua, cuando te dan la mano para levantarte cuando caes, entonces es necesario reflexionar la influencia tan importante que le han dado a tu quehacer personal y profesional y agradecer eternamente lo que han hecho por ti.

Mamá, te agradezco el haberme llenado de amor y cariño, por soportar el camino de adversidades para apoyarme en el logro de mis metas mostrándome el camino de la responsabilidad, del deber y sobre todo la esperanza de la vida.

Gisella, el amor que despiertas en mi cada mañana me sorprende a diario, lograste romper esa dura roca incapaz de expresar sentimientos, de sentir la confianza en el ser humano; aceptaste las decisiones tomadas porque me ayudarían, aun a pesar de afectarte, te estaré agradecido el resto de mi vida.

Karla, eres el mayor logro que he obtenido, aun más considerando que eres el fruto del amor de dos personas; tu sola mirada es pago suficiente a los sacrificios que tuve que realizar, el solo decirme papito, es más que suficiente para agradecer a Dios lo afortunado que soy.

Dr. Santos, el éxito en la vida se debe principalmente a los modelos de vida que seguimos de nuestros maestros, el ejemplo con el quehacer diario en lo profesional, pero con mayor énfasis en lo personal; nuestro comportamiento es fruto de los buenos hombres por quien somos influenciados, muchas gracias por formarme como ser humano y como profesional.

Muchas gracias a todos aquellos que me ayudaron e impulsaron, a los pacientes que participaron y a mis profesores y compañeros.

ÍNDICE

Agradecimientos	2
Resumen	5
Introducción	6
Marco teórico	11
Justificación	24
Planteamiento del problema	26
Hipótesis	28
Objetivo	29
Material y métodos	30
Población de estudio	30
Criterios de selección	33
Métodos de electroforesis de isoenzimas (zimodemos)	34
Cultivo de materia fecal en medio de Robinson	34
Lizado de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	35
Técnica de zimodemos	36
Gel de almidón de arroz	36
Cámara de electroforesis	37
Montaje de las muestras	37
Montaje del gel en la cámara de electroforesis	38
Tinción de los geles de almidón de arroz	39
Reacción en cadena de la polimerasa	41
Extracción de ADN de materia fecal	41
Reacción en cadena	43
Análisis estadístico	45
Resultados	46
Discusión	50
Conclusiones	56
Bibliografía	58
Anexos	67

RESUMEN

Introducción. Existen dos cepas de *Entamoeba histolytica*, morfológicamente idénticas pero con diferencias enzimáticas, inmunológicas y genéticas; la patógena y no patógena, *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente.

Objetivo. Establecer la confiabilidad de reacción en cadena de polimerasa (PCR) directamente de materia fecal para diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* con sondas descritas que reportaron poblaciones mixtas.

Material y métodos. Materia fecal positiva por microscopia de luz y confirmada en la institución, inoculadas en Robinson para su crecimiento y lizado de trofozoitos realizándose zimodemos y clasificación dentro de XXIII patrones descritos. Se extrajo ADN directamente de materia fecal y se realizó PCR con sondas ya descritas.

Resultados. Se recolectaron 2,560 muestras, visualizándose por duplicado 1,813 con 238 positivas por microscopia logrando cultivo positivo de 27% (64/238) y con crecimiento para zimodemos en 16, mismas que se realizó PCR. Se clasificó 15 como no patógenas (I=12, XV=2, XVI=1) y una patógena (II=1) por zimodemos, y por PCR 15 no patógenas quedando incluida la cepa patógena por zimodemo y se obtuvo una patógena que por zimodemo correspondió a no patógena.

Conclusiones. La eficacia del cultivo fue baja (27%) y solo 16/64 ideales para zimodemos. Los resultados por ambos métodos corresponden a presentación clínica (90% asintomáticos), ya que identificaron 94% como no patógenas; los resultados cruzados con ambos métodos, podría explicarse como error en procedimiento (todos por duplicado), además de que las sondas de PCR fueron diseñadas de región no codificante del gene ARNr. Es necesario diseñar sondas de zonas codificantes para diferenciar ambas cepas.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales continúan como un problema de salud pública mundial debido a su estrecha asociación con medio socioeconómico bajo y malos hábitos higiénicos. La amibiasis producida por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, es una enfermedad prevenible y curable que ha alcanzado una cierta estabilidad epidemiológica y que afecta principalmente a los países no desarrollados (1). Es considerada como una representante fiel de lo que se ha denominado patología de la pobreza; ha llegado a observarse en países con gran desarrollo económico, pero su frecuencia es incomparablemente más alta en aquellos que no lo poseen. México se encuentra entre las naciones que se consideran los máximos representantes mundiales de dicho padecimiento conocido en los medios de investigación de esta parasitosis como "las patrias de la amibiasis" (1).

La infección amibiana se ha estimado que presenta una frecuencia del 10 al 12% de la población mundial, incrementándose en zonas tropicales. En 1981 se menciona que aproximadamente 480 millones de personas en el mundo portaban el parásito, con una morbilidad de 36 millones de casos y una mortalidad de 40 mil pacientes (2).

La frecuencia en México varía de 0 a 55% de la población, basados en encuestas realizadas en portadores asintomáticos, presencia de anticuerpos y casos nuevos. Desde el año de 1974 la inspección serológica nacional, con casi 20,000 muestras clínicas, mostró una frecuencia de 6% con anticuerpos detectables por contrainmunolectroforesis (2,3). En 1989 se calculó que seis millones de personas fueron seropositivas para *E. histolytica*, cerca de un millón estuvieron infectadas en el momento y aproximadamente 200 mil sufrieron disentería o absceso hepático (1). En

una investigación serológica más reciente (1994), en donde fueron analizadas 67,668 muestras sanguíneas se encontró una frecuencia de 8%, esto nos traduce que en nuestro país no se ha registrado gran variación en las cifras epidemiológicas en los últimos años (4).

El problema para establecer una cifra epidemiológica real a nivel mundial se debe a la sensibilidad de los múltiples y diferentes procedimientos diagnósticos utilizados, además de la tendencia a sobrestimar esta enfermedad en áreas endémicas debido al gran número de casos clínicos de diarrea y disentería, a la realización de los exámenes de heces por profesionales sin experiencia, la excreción intermitente de quistes y la persistencia de anticuerpos serológicos (2).

La contaminación de alimentos con quistes maduros provenientes de portadores, la transmisión de persona a persona, el saneamiento insuficiente y los hábitos higiénicos inadecuados son los mecanismos más frecuentemente identificados en la transmisión de este parásito (1, 5, 6).

Entre los grupos de alto riesgo se encuentran viajeros, inmigrantes, trabajadores emigrantes, individuos inmunocomprometidos, individuos internados en instituciones mentales y homosexuales masculinos sexualmente activos (6).

La primera descripción del trofozoíto de *Entamoeba histolytica* es atribuida a Lösch en 1875 llamándola *Amoeba coli* (5); pertenece a la superclase de protozoarios formadores de pseudópodos Rhizopoda, dentro del subfilo Sarcodina; es una de las seis amibas del género *Entamoeba* que son conocidas para infectar al hombre. El ciclo vital no es complejo, incluye trofozoítos uninucleados, prequiste uninucleado, quiste con dos o cuatro núcleos, metaquistes y trofozoítos metaquísticos uninucleados (7); el quiste logra sobrevivir durante semanas o meses en un medio ambiente húmedo

apropiado; la ingestión del quiste resulta en el desenquistamiento en el interior del intestino delgado con la infección del colon por los trofozoítos, los cuales solamente experimentan un enquistamiento y fuera del organismo degeneran en el curso de minutos, son rápidamente destruidos por el pH ácido y las enzimas presentes en el medio gástrico; una de las principales razones de la elevada prevalencia de la enfermedad en todo el mundo es el estado de quiste lo cual le permite atravesar todas estas barreras gástricas y soportar el medio ambiente adverso (5, 6).

La gran mayoría (90%) de los pacientes son portadores asintomáticos, y únicamente el 10% presenta sintomatología clínica, siendo las formas extraintestinales las más graves y con riesgo para la vida (1, 5, 6). Tratando de explicar estas dos conductas clínicas, Brumpt desde 1925, sugirió dos diferentes clases de amiba, una que ocasiona enfermedad llamándola *Entamoeba dysenteriae* y otra totalmente benigna asignándole el nombre de *Entamoeba dispar* (8), fundamentando esta clasificación exclusivamente en observación clínica, motivo por el cual no fue aceptada. El primer soporte bioquímico para esta hipótesis, fue realizada en 1978 por Sargeant y Williams (9-11) en base a diferente patrón de migración electroforética (Zimodemos) de cuatro enzimas glicolíticas, clasificándolas en patógenas (actualmente llamada *E. histolytica*) a las que ocasionan enfermedad y no patógenas (actualmente llamada *E. dispar*) para las benignas. En los últimos diez años se han establecido diferencias genéticas y moleculares que apoyan esta hipótesis (7, 12).

En la actualidad el diagnóstico mundialmente utilizado para la identificación de amibiasis intestinal es la microscopía de luz de materia fecal en dos fases, la primera por concentración en búsqueda de quistes y la segunda un frotis de moco fecal en búsqueda de trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* (2), el cual no establece la

diferencia de estos dos tipos de cepas, motivo por el cual se desarrollaron nuevos métodos que permitieran diferenciarlas, como Técnica Inmunoabsorbente con Enzima (ELISA) en materia fecal con anticuerpos monoclonales (13) y técnicas de biología molecular (14, 15).

En contraparte, existe otra hipótesis con menor fundamento teórico y actualmente en vías de desuso, en la que se expone un sólo tipo de cepa, la cual presenta una virulencia cambiante y dependiente de factores del huésped, medio ambiente y el mismo parásito (1, 5).

El tratamiento de la amibiasis se realiza en base a metronidazol y/o emetina en el caso de amibiasis invasiva, sin existir controversia en este punto. Existe actualmente la duda de que los pacientes asintomáticos y con presencia de amibiasis intestinal (presumiblemente cepa no patógena o *E. dispar*) requieran realmente tratamiento, teniendo en consideración los efectos secundarios indeseables y el gran gasto público que ocasiona, además de tratarse de la gran mayoría de los pacientes (5, 6). Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que debe intentarse establecer a *Entamoeba histolytica* como agente causal y administrar tratamiento y en caso de identificarse *Entamoeba dispar* el tratamiento es innecesario (16).

La prevención de la amibiasis intestinal y extraintestinal (principalmente el absceso hepático) constituye dos propuestas inmunológicas diferentes, por supuesto, al prevenir la primera se prevendría automáticamente la segunda, sin existir hasta el momento una vacuna convincente de inmunidad protectora efectiva contra la amibiasis intestinal recurrente aunque existen ensayos prometedores con vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) para inhibir la adherencia del trofozoíto (17) y en lo

que respecta a la inmunidad para absceso hepático amibiano, se han utilizado múltiples antígenos de *E. histolytica* a nivel experimental con una eficacia que va desde un 64% hasta un 100% con el antígeno de una proteína rica en serina (18) y 54% de eficacia con un antígeno de una proteína de 29 kilodaltons (kDa) (19). Por lo tanto, en el momento actual, en cuanto a la prevención de la amibiasis, el mejor mecanismo es el control de su transmisión, incluyendo buena higiene, saneamiento ambiental y tratamiento de las aguas (1, 20).

MARCO TEÓRICO

Brump en 1925 estableció por primera vez la hipótesis de la existencia de dos diferentes cepas de *Entamoeba histolytica*, las cuales eran morfológicamente iguales, pero presentaban un patrón clínico diferente, una que era productora de enfermedad y otra que se comportaba de manera totalmente inocua, llamándolas *Entamoeba disenteriae* y *Entamoeba dispar* respectivamente (8). Esta hipótesis no fue aceptada debido a su único fundamento clínico de la infección de gatos con cepas de *E. histolytica* obtenidas de portadores asintomáticos y la no consecuencia de enfermedad, además de su no diferencia morfológica al microscopio. Fue hasta 1978 en que Sargeunt y Williamas (9-11) presentaron la primera evidencia bioquímica para establecer esta diferencia, en donde se aislaron en medio monoxénico de Robinson (21) cepas de *E. histolytica* de 85 pacientes que cursaban con amibiasis intestinal y extraintestinal caracterizándolas en base a su velocidad de corrimiento electroforético de cuatro isoenzimas: Glucosa fosfato isomerasa (GPI), Fosfoglucomutasa (PGM), L-malato:NADP⁺ oxidoreductasa (ME) y Hexoquinasa (HK), y fueron clasificadas como cepas patógenas aquellas aisladas de pacientes con absceso hepático amibiano ó pacientes con diarrea mucosanguinolenta y con identificación de trofozoítos hematófagos y llamó cepas no patógenas a las procedentes de pacientes totalmente asintomáticos. Este método de clasificación es llamado electroforesis de isoenzimas o Zimodemos, y es definida como una población en la cual la movilidad electroforética de enzimas específicas difiere en poblaciones similares, método que ha sido utilizado también como marcador genético en plantas (22).

A través del tiempo y de más de 6,000 aislados clínicos patógenos y no patógenos Sargeant ha demostrado una correlación positiva entre el patrón electroforético y la asociación clínica de las cepas aisladas. Hasta el momento se han identificado 23 diferentes zimodemos de amiba, de los cuales diez han sido asociados a enfermedad (cepas patógenas) en el huésped (II, II gama, VI, VII, XI, XII, XIII, XIV, XIX, y XX) y son caracterizados por tener una banda alfa en PGM y una banda de migración rápida en HK siendo los restantes patrones no patógenos (I, III, III alfa, IV, V, VIII, IX, X, XV, XVI, XVII, XVIII, y XXI) (23, 24). Los zimodemos presentan serios problemas de aplicabilidad: requieren del cultivo monoxénico del parásito, el cual tiene una eficacia máxima de 36 a 50% en el mejor de los casos, consumo de tiempo, ya que requiere de al menos de 72-96 horas para su crecimiento y necesitando como mínimo una cosecha de 50,000 trofozoítos para obtener la cantidad suficiente de isoenzimas para su caracterización, además del personal capacitado y experimentado y un costo elevado (7, 25, 26), por lo cual es una técnica que no es factible desarrollarla en los laboratorios de rutina. A pesar de este gran número de problemas que presentan los zimodemos, es considerado como el estándar de oro para la caracterización de patogenicidad de *E. histolytica* (7, 27).

En contraparte y con el objetivo de valorar la confiabilidad de los zimodemos, se realizaron investigaciones donde en base a cambios en las condiciones del cultivo durante axenización de una cepa se encontró alteración en su migración enzimática de un patrón no patógeno inicial a un patrón patógeno y al reinstalar las condiciones estándar regresó a su estado inicial no patógeno (28-30); para tratar de establecer la reproducibilidad de estas investigaciones, Clark, Cunnick y Diamond reprodujeron los experimentos de manera exhaustiva sin lograr el objetivo, con lo que concluyeron la

buena estabilidad de los zimodemos y que las conversiones reportadas pudieran tratarse de otras especies distintas de *E. histolytica* (31), conclusión que fue aceptada por los autores que inicialmente describieron ésta conversión. Otro sustento, pero de manera clínica, es el hecho de que nunca se ha aislado una cepa con patrón no patógeno de un paciente con sintomatología clínica, aunque con muy baja frecuencia se han reportado cepas patógenas de pacientes asintomáticos (1).

Hay suficientes evidencias genéticas que apoyan la hipótesis de que se trata de dos diferentes cepas, tales como sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) específicas de *E. histolytica* que hibridizan para cepas patógenas ó no patógenas comparadas con zimodemos (32, 33); además de que los genes de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) son diferentes por secuenciación en un 1.7% (34) entre ambas cepas, estando éstas diferencias localizadas en las regiones variables reconocidas de la pequeña subunidad del ARNr (35, 36) y un gene codificante para la enzima superóxido dismutasa conteniendo hierro son diferentes en 5% de sus nucleótidos entre cepas patógenas y no patógenas (37). A raíz del gran número de evidencias inmunológicas, genéticas y moleculares apoyando la hipótesis de que se trata de dos diferentes cepas, se ha iniciado con el uso de la diferente nomenclatura de *Entamoeba histolytica* para cepa patógena o productora de enfermedad y *Entamoeba dispar* para cepa no patógena o presente en portadores asintomáticos (16, 38).

Con el advenimiento de técnicas de biología molecular, el estudio de *E. histolytica/E. dispar* ha logrado avances importantes en los últimos 10 años, principalmente en lo que respecta a su análisis genético para tratar de establecer las diferencias entre éstas dos tipos de cepas (39-41). La mayoría de los estudios iniciales han sido realizados en

cepas axénicas de referencia, las cuales se aislaron hace aproximadamente 40 años, tales como HM-1:IMSS, HK9, NIH:200, SAW 1769 entre otras (1, 25).

El diagnóstico actual y universalmente utilizado en México y el mundo para la identificación de amibiasis intestinal es la microscopia de luz, en donde por medio de la observación de un frotis de moco fecal fresco, obtenido con cucharilla rectal, se buscan trofozoítos de *E. histolytica*/*E. dispar*, presentando la necesidad de realizar la observación dentro de los primeros 30 minutos de recolectada la muestra, debido a la corta viabilidad de los trofozoítos a medio ambiente; la muestra debe ser diluida en solución fisiológica para observar los característicos movimientos ameboides en un solo sentido, además de tratar de identificar trofozoítos con eritrocitos fagocitados, con el objetivo de poder inferir, sin lograr asegurar, que se trata de *E. histolytica* y no de *E. dispar*; éstas estructuras son fácilmente confundidos con macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, lo que lleva a sobrediagnosticar erróneamente (2, 5, 6). Como una segunda parte de la microscopia de luz se realiza concentración de la materia fecal por diferentes métodos (flotación con sulfato de zinc, sedimentación con acetato etil formalina, etc.) en búsqueda de formas quísticas, detectando por estos métodos de concentración 40-50% mayor positividad que la examinación directa de moco fecal fresco. Los quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* son fácilmente confundidos con quistes de otras especies de parásitos, principalmente *Entamoeba coli*, *Iodamoeba* ó *Endolimax*, ya que sus únicas diferencias son en cuanto al tamaño y al número de núcleos (2).

Es necesaria la observación de por lo menos tres o más muestras de materia fecal, de diferentes días (por la excreción intermitente de quistes), para lograr identificar más del 80-90% de muestras positivas, con el requisito de una amplia experiencia por

parte del técnico microscopista (5). La microscopia de luz es un método tedioso, requiere gran consumo de tiempo, es caro y es necesario un alto grado de experiencia; presenta además para la examinación exacta de las heces, la dificultad de los múltiples factores que pueden interferir es su interpretación y subdiagnóstico tales como: drogas (tetraciclinas, sulfonamidas, antiprotozoarios), laxantes, antiácidos, antidiarreicos, y medios de contraste radiológicos (2, 5, 26).

La microscopia de luz de materia fecal en sus dos partes, la examinación fresca y por concentración, no permite realizar la diferencia de ambos tipos de cepa, *E. histolytica* y *E. dispar*, debido a que ambas son morfológicamente idénticas, con la única característica de que si son observados trofozoítos hematófagos en el frotis de moco fecal fresco se puede presumir que se trata de *E. histolytica*.

Otro método utilizado para el diagnóstico de amibiasis es la serología, la cual traduce contacto sin especificar el momento, presentando mayor positividad aquellos pacientes que han sufrido absceso hepático amibiano (85-90%). En los pacientes con amibiasis intestinal grave que requieren hospitalización, presentan anticuerpos positivos únicamente del 50% al 80%. Inicialmente se tenía el concepto de que solo *E. histolytica* (cepas patógenas) provocaban la producción de anticuerpos, pero se ha visto que hasta un 22% de los casos las cepas de *E. dispar* (no patógenas) también provocan positividad serológica (1, 2, 42, 43). Otros métodos serológicos desarrollados con anticuerpos para una proteína rica en serina (SREHP) e identificados por Western blot presentaron una sensibilidad de 65% y una especificidad de 95% usando como estándar de oro a la difusión en gel de agarosa y contrainmunolectroforesis, identificando únicamente *E. histolytica* (cepas patógenas) (44, 45). Así mismo se desarrollaron anticuerpos para histolisina, la principal

proteínasa cisteína (con participación en la invasión tisular), identificados por inmunoensayo en fase sólida encontrando positividad en un 72.7% en pacientes con absceso hepático amibiano (n=22), 18.1% en portadores asintomáticos (n=33) y 2.5% en pacientes sanos (n=40) (46). Otra prueba serológica con base en anticuerpos monoclonales para una proteína de 66 kDa (localizada en la superficie del trofozoito y con participación en la adhesión a eritrocitos), identificó por inmunoblott en muestras clínicas purulentas obtenidas de absceso hepático amibiano (n=10) al 100% de los casos (47).

Debido a la necesidad de desarrollar una técnica de laboratorio que establezca el diagnóstico y la diferencia entre cepas patógenas de *E. histolytica* y no patógenas de *E. dispar* en un solo momento, con buena confiabilidad, y pensando en todos los problemas que implica realizar los zimodemos en un laboratorio de rutina, iniciaron las investigaciones en base al desarrollo de anticuerpos monoclonales, inicialmente a nivel de cepas de referencia, en donde se usó un anticuerpo monoclonal tipificado como inmunoglobulina G subclase 1 que reconoce por inmunofluorescencia (IFA) un componente de 30,000 Mr y que reaccionó únicamente con trofozoitos cultivados de cepas patógenas (*E. histolytica*) (48). En otro estudio, en donde se usaron cepas de referencia y muestras clínicas se aplicó una lectina de adherencia galactosa-específica para cepas patógenas (*E. histolytica*), con una sensibilidad y especificidad de 100% por radioinmunoensayo (RIA) comparado con zimodemos, presenta el problema de que todos los experimentos fueron realizados de trofozoitos obtenidos de cultivos axénicos o monoaxénicos y no directamente de la muestra clínica, además de que las cepas no patógenas (*E. dispar*) son diagnosticadas por exclusión (49). Posteriormente fue publicado otro trabajo en donde se usó también un anticuerpo monoclonal que

reacciona para una proteína interna con peso molecular de 84 y 81 kDa en cepas axénicas y polixénicas respectivamente, identificado por IFA, en donde presenta para cepa invasiva (*E. histolytica*) una correlación de 100% con zimodemos, presentando los mismos problemas de la técnica anterior de requerir cultivar al parásito a partir de la materia fecal (50).

En cuanto al uso de material genético, Samuelson y cols. desarrollaron por clonación una sonda de ADN para hibridación directamente de la materia fecal que presentó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93% para diagnóstico de amibiasis intestinal usando como estándar de oro a la microscopia de luz, con el problema de no distinguir entre *E. histolytica* (cepas patógenas) y *E. dispar* (no patógenas); las clonas diagnósticas fueron secuenciadas, encontrando un segmento de 145 pares de bases (pb) de longitud rica en adenina (A) y timina (T) específica de especie altamente repetida en el genoma (aproximadamente 50 a 100 veces) de *E. histolytica* (51). Posteriormente Garfinkel y cols. desarrollaron por subclonación esta misma sonda de 145 pb encontrándola específica para *E. histolytica* (cepas patógenas), pero con una frecuencia de repetición en el genoma de aproximadamente 15 veces y además encontraron otro fragmento genómico de 133 pb específico para *E. dispar* (cepas no patógenas) y con una frecuencia en el genoma de aproximadamente 14 veces; ambos fragmentos genómicos fueron secuenciados y encontraron una homología de 44% en sus pb; el problema que radica en este trabajo es que los experimentos fueron desarrollados a partir de trofozoítos obtenidos de cultivos axénicos y monoaxénicos (32).

Los trabajos presentados hasta el momento y de manera conjunta permiten realizar el diagnóstico de amibiasis así como su caracterización, pero presentan el serio problema

de la necesidad de aislar al parásito en cultivo, tomando en consideración de que el aislamiento inicial es en cultivo monoxénico, el cual no tiene una eficacia ideal (35-50%), por lo que desde ese momento es ya selectivo para cierto tipo de cepas con características especiales que les permiten su aislamiento en cultivo, dejando por lo tanto un porcentaje de cepas no aisladas y en las cuales desconocemos su caracterización, por lo cual estos métodos continúan como poco aplicables a laboratorios de rutina y representatividad epidemiológica (52, 53).

En lo que respecta a métodos diagnósticos realizados directamente en materia fecal usando anticuerpos monoclonales, sin necesidad de cultivo y que permitan establecer la caracterización de patogenicidad, se usó el anticuerpo monoclonal para la adhesina galactosa específica identificados por ELISA, en donde únicamente detecta a las cepas de *E. histolytica*, presentando una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97%, usando como estándar de oro a los zimodemos, presentando el problema de que el examen se tiene que realizar en las primeras 24 horas de obtenida la muestra y de que las cepas no patógenas de *E. dispar* se diagnostican por exclusión (13). Una publicación posterior usando ELISA con anticuerpos monoclonales contra epitopes 3 (7F4) y 4 (8C12) de la adhesina galactosa ambiental específicos de *E. histolytica* permite la identificación de éste tipo de cepas con una sensibilidad de 96% y especificidad de 93% usando como estándar de oro a los zimodemos, nuevamente con el problema del diagnóstico de *E. dispar* por exclusión; y usando epitopes 1 (3F4) y 2 (8A3) comunes para ambas cepas presentó una sensibilidad de 87% y una especificidad de 97% (38). Recientemente fueron evaluados cuatro ELISAs directamente de materia fecal y comercialmente disponibles en donde se encontró que los dos métodos para identificar infección por *Eh/Ed* sin establecer diferencias de

cepas presenta una concordancia mayor a 90%; y las específicas para *Eh* identificó solo con títulos serológicos positivos > 1:512 y evidencia clínica de infección invasiva (27). Así mismo, el uso del triple panel de inmunoensayo enzimático para detección de antígenos de *Giardia lamblia*, *Eh/Ed* y *Cryptosporidium parvum* muestran sensibilidad y especificidad muy altas pero sin permitir establecer la diferencia entre ambos tipos de cepas (54).

Entre las múltiples y recientes técnicas que se están utilizando para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual es definida como la síntesis y amplificación enzimática *in vitro* de secuencias específicas de ADN, produciendo en pocas horas más de un millón de copias a partir de una sola molécula de ADN (55). El principio de la PCR se basa en la repetición de ciclos que están compuestos cada uno por tres simples reacciones, las cuales varían únicamente en la temperatura de incubación; (56).

Los tres pasos implicados en este procedimiento son: la denaturación, la alineación, y la síntesis. Una característica esencial del procedimiento de PCR es que todos los nuevos productos sintetizados actúan como plantilla o template para sintetizar nuevo ADN en cada uno de los 20-40 ciclos; el resultado de esta bien llamada reacción en cadena es la multiplicación geométrica de nuevos productos de ADN (56). Una de las mayores ventajas de la técnica de PCR es el hecho de que la muestra clínica que se someterá a escrutinio puede contener ADN de otros microorganismos; en teoría, la PCR puede amplificar un fragmento del ADN de sólo 25 pares de bases (pb) de longitud (57).

La sensibilidad de la PCR esta basada primariamente en dos factores: 1) el número de moléculas blanco presentes en la muestra y 2) la complejidad de las secuencias de

ADN no blanco. El "hot start" (principio caliente) es una estrategia que permite mayor eficiencia del procedimiento, así como una estrategia anidada o "nested PCR", la cual consiste en una segunda PCR con oligonucleótidos que se alinean a secuencias internas vecinas de las alineaciones de los oligonucleótidos iniciales (58). La especificidad deriva de la precisión de la reacción de alineación de ADN-ADN complementario, el cual consiste en el tamaño y diseño del oligonucleótido determinando si su secuencia puede aparecer más de una vez en una muestra de ADN y con ello también determinará si puede iniciar la síntesis en sitios múltiples, para eliminar este tipo de problemas se usan temperaturas elevadas durante cada ciclo, el ajuste de concentración de sales como el magnesio, el cual determina parcialmente la facilidad de hibridación (56, 58, 59).

Debido a la gran sensibilidad y especificidad de la PCR, es fácil tener una contaminación de los ensayos resultando en falsos positivos, para lo cual se refieren varias consideraciones en cuanto a la utilización del espacio físico en los diferentes procedimientos, uso de material estéril, uso de material desechable, utilizar mezclas maestras de los reactivos; agregar como último paso el ADN blanco y elegir cuidadosamente los controles positivo y negativo (60).

La excelente utilidad de PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y genéticas ha sido ampliamente demostrado (61), considerando de manera importante el hecho de que no es necesario la viabilidad del microorganismo en investigación para su identificación, sino únicamente la presencia de material genético no degradado, como ha sido demostrado en el uso en antropología. Su utilidad clínica ha sido aplicada en entidades médicas como en el diagnóstico de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* (62, 63), diagnóstico de encefalitis por virus Herpes simple

(64), detección del parásito *Plasmodium falciparum* directamente en sangre (65), diagnóstico de fiebre de montañas rocallosas directamente en sangre y orina (66), diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia tipo 1 (67), correlación de la carga viral en pacientes con infección con VIH y sobrevivida a largo plazo (68), etc.

La microbiología clínica es uno de los últimos campos en incorporar estas técnicas basadas en ácidos nucleicos (PCR) para el estudio y diagnóstico de enfermedades infecciosas parasitarias. Se encuentra actualmente en uso con *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia* por mencionar algunos (12).

La aplicación de la PCR para la identificación y diferenciación de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* directamente de materia fecal fue propuesto inicialmente por Romero y cols en donde usando sondas no radioactivas específicas (descritas por Garfinkel) para amplificar un segmento de 145 pb para cepas de *E. histolytica* y un segmento de 133 pb para cepas de *E. dispar*, localizados extracromosomalmente, mostraron una sensibilidad de 94% y una especificidad del 100% para la identificación del parásito en materia fecal usando como estándar de oro a la microscopia de luz (n=84); en cuanto a su diferenciación en *E. histolytica* (n=8) presentó una sensibilidad de 93% y una especificidad de 100% y en las cepas de *E. dispar* (n=9) una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97%, usando en ambas como estándar de oro a la hibridación no radioactiva y zimodemos (14); dentro de los resultados presentados llama la atención que el 93% (n=78) de las muestras clínicas fueron positivas para ambas sondas de ADN por lo que se clasificaron como mixtas. Posteriormente se desarrolló otro trabajo en una comunidad rural en el sur de México en donde se usó PCR y las mismas sondas específicas de 145 y 133 pb para

establecer el diagnóstico de amibiasis intestinal y la caracterización de patogenicidad; el estándar de oro utilizado fue nuevamente la microscopia de luz, la cual no establece la diferenciación entre ambas cepas, presentando una sensibilidad de 96% (n=24) y una especificidad de 98% (n=176) para el diagnóstico de amibiasis intestinal; en cuanto a la caracterización de patogenicidad no presentaron estándar de comparación; de nuevo llama la atención que los resultados presentados en este trabajo arrojó tres diferentes poblaciones: a) el 56% (n=14) fueron positivas para ambas cepas (*E. histolytica* y *E. dispar*); b) el 36% (n=9) fueron positivos únicamente para *E. histolytica* y c) el 8% (n=1) fue positivo únicamente para *E. dispar*, lo que traduce que el 92% de los pacientes son excretores de quistes de cepa patógena de *E. histolytica* (15). Otro trabajo publicado más recientemente buscando optimizar la técnica de extracción de ADN a menor tiempo de realización y a temperatura ambiente para mayor aplicabilidad a laboratorios de rutina y usando PCR y sondas que amplifican un gene de la pequeña subunidad ribosomal de ARN descrita por Clark y cols lograron detectar un trofozoíto por miligramo de materia fecal (n=4), presentando el problema de que la mayoría de los pacientes (90%) excretan quistes, lo cual es determinante para la aplicación de esta variación técnica (35, 69).

Estos tres últimos trabajos, son los que inicialmente usaron la técnica de PCR para el diagnóstico y caracterización de *Entamoeba histolytica/E. dispar* directamente de materia fecal evitando el cultivo, demostrando que tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de amibiasis intestinal, pero con la controversia de los resultados presentados en cuanto a poblaciones mixtas, contrario a poblaciones únicas que resultan de la caracterización por zimodemos, motivo por el cual se requiere estudiar la total aplicabilidad de esta técnica en la caracterización de éste

parásito, así como los primers usados son los adecuados para establecer el diagnóstico y diferenciación, tomando en consideración que la aplicabilidad clínica en otras entidades infecciosas ha sido plenamente demostrada.

JUSTIFICACIÓN

La amibiasis intestinal es una protozoosis que afecta a individuos de todas las regiones del mundo, sin embargo, su impacto más importante como problema de salud pública se observa en los lugares en los cuales el saneamiento ambiental y el nivel socioeconómico son precarios, sin que haya una relación clara con el clima o las variaciones estacionales, así mismo, considerando la alta frecuencia de personas infectadas mundialmente (10-12%) el número absoluto de éstos pacientes es de considerable importancia y más aun aquellos que desarrollarán amibiasis grave, por lo cual continua como un problema prioritario de salud a nivel mundial (1).

Las evidencias genéticas, basadas en biología molecular principalmente, de la existencia de dos diferentes tipos de cepas de *Entamoeba* que infectan al ser humano, una patógena productora de enfermedad (actualmente llamada *E. histolytica*) y otra no patógena que se comporta de manera inocua (llamada *E. dispar*), han estimulado la investigación para el desarrollo de pruebas diagnósticas que nos permitan realizar esta diferenciación, sin la necesidad del tedioso, costoso y gran consumo de tiempo del cultivo con su posterior análisis electroforético de enzimas glicolíticas (zimodemos), así como la aplicación de la microscopia de luz la cual no establece la diferencia entre las dos cepas (7, 9-12, 34).

Todas estas investigaciones se han realizado con el objetivo de poder aplicar a corto o mediano plazo estos nuevos métodos diagnósticos al conocimiento real de la epidemiología de *E. histolytica/E. dispar* en primera instancia, así como su posterior aplicación en estudios longitudinales para resolver la disyuntiva actual de prescribir tratamiento a todos los pacientes portadores de amiba o únicamente a aquellos que se

les identifiquen cepas capaces de producir enfermedad (cepas patógenas/*E. histolytica*), considerando la disminución a gran escala de la desviación de recursos económicos, materiales, y de personal, así como en el mejor conocimiento de la patogenia de este parásito (1, 20).

Por los motivos anteriores, es necesario intensificar y valorar reproducibilidad de los métodos diagnósticos desarrollados directamente de las muestras clínicas (materia fecal), debido que al establecer la aplicabilidad de éstos procedimientos se podría iniciar con el estudio epidemiológico basados en la clasificación de ambos tipos de cepas, así como en la toma de decisiones para la administración de terapia curativa con drogas antiparasitarias, las cuales presentan efectos indeseables de consideración. Sin olvidar, que en base al establecimiento de este tipo de estudios, se deriva otra línea de investigación de la misma trascendencia, pero a largo plazo, que es el desarrollo y valoración de la eficacia de vacunas orales anti*amibianas*, las cuales tendrían un importante impacto en los campos médico, social, político, y económico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento de la investigación, únicamente se habían realizado dos estudios en donde se aplicó PCR directamente de la materia fecal para el diagnóstico y diferenciación de ambos tipos de cepa, *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* y en donde se usaron oligonucleótidos específicos para segmentos extracromosomales de ADN de 133 pb para *E. dispar* (cepa no patógena) y un segmento de 145 pb para *E. histolytica* (cepa patógena).

Inicialmente Romero y cols presentan una alta sensibilidad y especificidad de la prueba usando como estándar de oro a zimodemos, pero con el dato interesante de que el 93% de las muestras analizadas por PCR (84) son mixtas y con el punto en contra de que sólo a 17 se les realizó zimodemos (estándar de oro).

Posteriormente Acuña y cols. realizaron otra investigación usando los mismos oligonucleótidos y como estándar de oro a la microscopia de luz en donde se analizaron 24 muestras clínicas, arrojando resultados muy similares a los de Romero y cols, presentando tres poblaciones diferentes y en donde nuevamente la gran mayoría (92%) son portadores de *E. histolytica* (cepa patógena), que es en primera instancia la cepa de mayor interés desde el punto de vista clínico y epidemiológico.

Al analizar de manera global ambos estudios, vemos que presentan datos importantes en cuanto al tipo de cepa y la presentación clínica en los pacientes, considerando que el primero de los estudios hace referencia de población mixta con una tamaño de muestra de 84 muestras clínicas, realizándose únicamente a 17 el estándar de oro (zimodemos) y sin hacer referencia si éstas últimas muestras clínicas corresponden total o parcialmente a población mixta; en cuanto a la segunda investigación presenta

también una población mixta importante, pero no presenta ningún estándar de oro de comparación o confirmación.

Considerando que ambos estudios utilizaron la misma técnica así como los mismos oligonucleótidos, y analizándolos de manera conjunta, presentan resultados prácticamente iguales en cuanto a población mixta de cepas, pero que la gran mayoría corresponden a cepas patógenas (14, 15), en contraparte con los resultados que han arrojado los estudios realizados con el estándar de oro (zimodemos) en donde los pacientes presentan únicamente un tipo de cepa y en su gran mayoría cepas no patógenas (24, 32).

Basados en estos antecedentes es necesario plantearse la siguiente pregunta de investigación:

¿ La prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa directamente de materia fecal usando segmentos extracomosomales de ADN específicos de cada cepa logra diferenciar *Entamoeba histolytica* (cepas patógenas) de *Entamoeba dispar* (cepas no patógenas)?

HIPÓTESIS

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa realizada directamente de materia fecal usando segmentos extracomosomales de ADN específicos permite realizar la diferencia entre cepas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica/dispar*.

OBJETIVO

Establecer la confiabilidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa directamente de materia fecal para diferenciar cepas de *Entamoeba histolytica* (patógenas) de *Entamoeba dispar* (no patógenas) comparado con electroforesis de isoenzimas (zimodemos).

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La captura de las muestras fue de tres diferentes instituciones, dos localizadas en el Distrito Federal y una en el Estado de México, siendo ésta última donde se recolectaron la mayor cantidad de muestras. Las tres instituciones tienen localización urbana, pero la que corresponde al Estado de México se caracteriza por presentar alto índice de pobreza, así como mal saneamiento ambiental. Las instituciones son las siguientes:

Centro de Salud Metropolitano de la Secretaria de Salud localizado en Nezahualcóyotl, Estado de México. (CSMN)

Hospital General de México de la Secretaria de Salud localizado en el Distrito Federal (HGM).

Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Secretaria de Salud localizado en el Distrito Federal (HIMFG).

En el HIMFG, institución sede de la investigación, cuenta con laboratorio de parasitología intestinal, en donde laboran cuatro técnicos microscopistas, encargados del procesamiento y visualización de las muestras de materia fecal; todos los técnicos tienen al menos 25 años de experiencia en el diagnóstico de parasitosis intestinales por microscopia de luz, motivo por el cual fueron tomados como estándar de oro para la identificación de trofozoítos o quistes de *Entamoeba histolytica/E. dispar*. En el HGM laboran tres técnicos microscopistas con al menos 15 años de experiencia y en el CSMN labora un sólo técnico microscopista con experiencia de 1 año.

Debido a la mínima experiencia (un año) y problemas detectados durante el desarrollo del estudio y con el objetivo de incrementar la eficacia en la correcta identificación de las muestras clínicas de interés, fue capacitado el técnico microscopista del CSMN con un curso teórico práctico en microscopia de luz de un mes de duración para diagnóstico de parasitosis intestinales.

El método de recolección de las muestras fue por muestreo consecutivo y con un máximo de 24 horas desde el momento de la toma de la muestra por parte de los pacientes hasta la captura para la investigación; la materia fecal se recolectó en recipientes limpios de plástico no estériles, sin conservador y trasladadas al HIMFG en recipientes de unisel con refrigerantes plásticos para mantenerlas entre 4-8 °C y a ésta misma temperatura fueron conservadas hasta la decisión de su ingreso ó exclusión al estudio.

Todas las muestras fueron analizadas inicialmente por microscopia de luz en la institución de procedencia (CSMN y HGM) con sospecha de la presencia de trofozoítos ó quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* y posteriormente confirmadas en la institución sede (HIMFG) máximo 48 horas posterior a su recolección. Así mismo en el día de su recolección fueron inoculadas en medio de Robinson el cual fue revisado por microscopia de luz cada 24 horas en búsqueda de trofozoítos de *E. histolytica*/*E. dispar*, en caso de ser negativo al quinto día de su inoculación fueron considerados como negativos y excluidos; en el caso de encontrarlo positivo fueron inoculados 3 medios más y se realizó el lizado de trofozoítos cuando se tenía una cosecha mínima de 50,000 trofozoítos/ml por cultivo y máximo del segundo subcultivo (valorado por visualizar 20-30 trofozoítos por campo), conservados a -196 °C (nitrógeno líquido) en forma de perlas y en criotubos de plástico hasta su procesamiento de zimodemos; en

caso de no obtener el crecimiento mínimo requerido de trofozoítos fueron excluidos del estudio.

En tiempo máximo de una semana posterior a la confirmación de una muestra clínica con presencia de amiba, fue extraído el ADN directamente de la materia fecal y conservada a -20 °C en tubos eppendorf de plástico hasta su procesamiento por PCR; de la misma manera el resto de la materia fecal fue conservada a -20 °C como reserva en recipientes plásticos.

Las muestras fueron etiquetadas en número consecutivo progresivo al momento de cumplir los criterios de inclusión. Con el objetivo de cegar al investigador y evitar sesgos al momento de interpretar los resultados, los cultivos de Robinson se numeraron de manera consecutiva para la realización de zimodemos; para la PCR, una persona ajena a la investigación, cambió de manera aleatoria la numeración de las alícuotas de ADN extraído previo registro de la numeración inicial y almacenaje en sobre cerrado.

Todos los experimentos de PCR y zimodemos fueron realizados de manera simultanea y por duplicado. Se usaron como controles negativos las mismas muestras clínicas recolectadas en los diferentes centros de la investigación y que se catalogaron como positivas para otros parásitos diferentes a amiba y/o libres de parásitos y como controles positivos a la cepa HM-1:IMSS.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

INCLUSIÓN

- Muestra clínica con presencia de quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* identificada por microscopia de luz y confirmadas en la institución sede (HIMFG).
- Muestra clínica cultivada en medio de Robinson en donde se logró aislamiento de trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* confirmada por forma, tamaño y movimientos característicos visualizado por microscopia de luz.

NO INCLUSIÓN

- Muestra clínica confirmada como positiva para *E. histolytica/E. dispar* por microscopia de luz y sin cantidad suficiente de materia fecal para realizar cultivo en medio de Robinson y extracción de ADN (mínimo 10 gr).

EXCLUSIÓN

- Muestra clínica en donde se logró positividad en cultivo de Robinson sin un crecimiento suficiente de trofozoítos como máximo en el segundo subcultivo para la realización de zimodemos (mínimo de 50,000 trofozoítos/ml).

MÉTODOS DE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS (ZIMODEMOS)

Cultivo de materia fecal en medio de Robinson

Fue realizado como se encuentra descrito por Robinson (21).

- En un frasco de cristal de 7 ml con tapón de rosca con agar bacteriológico (1.5%) salino (0.7%) inclinado fueron colocados 5 mg de almidón de arroz, 4 gotas de eritromicina al 0.5% y llenado con medio BR (NaCl 85 mM, ácido cítrico 9 mM, fosfato de potasio dibásico 2 mM, sulfato de amonio 20 mM, sulfato de magnesio 0.2 mM, ácido láctico 4 mM, pH 7.0, e incubado a 37 °C durante 48 horas con *Escherichia coli* del grupo B); en este medio fue inoculado con un aplicador estéril de madera aproximadamente 5 mg de materia fecal e incubada durante 24 horas a 37 °C; el proceso fue realizado máximo 24 horas después de haber sido recolectada la muestra clínica.
- A las 24 horas de incubación, por medio de una pipeta pasteur, fue extraído todo el sobrenadante del frasco; se colocó nuevamente 2 gotas de eritromicina al 0.5%, 2 gotas de bactopectona al 20% estéril, 5 mg de almidón de arroz, 2/3 del frasco de bifalato de potasio 25 mM y 1/3 de medio BRS (medio BR y suero bovino inactivado 1:1 e incubado durante 24-48 horas a 37 °C) e incubado nuevamente por 24 horas a 37 °C.
- Posterior a las segundas 24 horas de incubación a 37 °C (48 horas en total), se tomó con pipeta pasteur un poco del sedimento de la parte donde se encuentra el almidón de arroz y montada una gota en un portaobjetos y teñida con lugol al 10% y cubierta con cubreobjetos y visualizada en un microscopio de luz con el objetivo de 10 X, en caso de observar positividad de cuatro cruces de trofozoítos

(más de 20-30/campo) fue realizado el lizado de estos últimos; en caso de encontrar menor positividad fue subcultivado (en medio BRS igual que en el paso anterior) máximo hasta 2 ocasiones para tratar de obtener 4 cruces de positividad para realizar el lizado de los trofozoítos, en caso de no encontrar positividad fueron alimentados y revisados a diarios por microscopia de luz y aquellos cultivos que después de 5 días persistió negativo fueron excluidos del estudio.

Lizado de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Realizado según se encuentra descrito por Sargeant (9)

- Del cultivo de Robinson que se encontró positivo ++++ (20-30 trofozoítos por campo), fue tomada la parte turbia superior de la capa de almidón de arroz, colocada en un tubo cónico de plástico nuevo y estéril y centrifugado a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se tiró el sobrenadante y el botón formado fue homogeneizado en solución para lisis (DL-dithiothreitol 200 mM, ácido n-caproico 200 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 200 mM pH 7.0) al mismo volumen que el botón formado (350-500 ul) y colocado durante 12 horas a -20 °C.
- Posteriormente fue descongelado a temperatura ambiente y centrifugado a 1,500 rpm por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante colocado en un tubo eppendorf nuevo.
- Con una pipeta pasteur y un bulbo de plástico fueron colocadas gotas de aproximadamente 20 ul, una a una en nitrógeno líquido para formar las perlas y posteriormente colocados en un criotubo y conservadas a -196 °C hasta su análisis por zimodemos.

TÉCNICA DE ZIMODEMOS

Para establecer la clasificación de patogenicidad de *Entamoeba histolytica/E. dispar* por medio de electroforesis de isoenzimas es basado en el patrón de electromigración de cuatro enzimas: EC 2.7.1.1 Hexoquinasa (HK), EC 2.7.5.1 Fosfoglucomutasa (PGM), EC 5.3.1.9. Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI), y EC 1.1.1.40 L-malato NADP+ Oxidoreductasa (ME) (9, 10).

Gel de almidón de arroz

- Se utilizó un molde construido de acrílico de 15 x 25 cm de longitud y 3 mm de grosor, el cual es colocado en una placa de cristal de las mismas dimensiones variando únicamente en su grosor (6 mm) y siendo ambas fijadas con cinta adherible; la placa de cristal es limpiada con alcohol absoluto para limpiar perfectamente de residuos de grasa.
- En un matraz de cristal delgado se prepara una solución al 30 mM de solución amortiguadora fosfato (200 mM, pH 7) para las enzimas ME y GPI; para las enzimas PGM y HK se prepara con solución amortiguadora Tris/Maleato/EDTA/Mg2Cl (100 mM, 85 mM, 1 mM, 1 mM, pH 7.4); esta solución es preparada con almidón de arroz al 9%, homogeneizada perfectamente y calentada directamente en mechero de bunsen hasta el punto de ebullición, en este momento es desaireado con bomba de vacío y es vertida sobre el molde de acrílico-cristal y quitado el exceso con un rasero, teniendo cuidado de que la superficie superior quede completamente uniforme; es cubierto de corrientes de aire y

colocado a 4 °C durante 10-12 horas. Después de éste tiempo se encuentra lista para montar las muestras.

Cámara de electroforesis

- Se usó una cámara de electroforesis construida de acrílico de 25.5 cm por 23.5 cm de diámetro y 9.5 cm de altura con 4 compartimientos a lo ancho, dos laterales de 8 cm y dos interiores de 3.5 cm, todos comunicados con un orificio en cada extremo de 3 mm de diámetro y con hilos de platino en ambos compartimientos interiores con su respectiva salida de corriente eléctrica; además con la presencia de dos ranuras de 1.5 cm para permitir la entrada y salida de las placas metálicas circulantes de agua.
- Estas cámaras fueron diseñadas y construidas en forma casera para usar placas metálicas circulantes de agua de 20 cm por 19 cm de diámetro.

Montaje de las muestras

- Al gel de almidón de arroz, después de haber sido mantenido 10-12 horas a 4 °C, con un peine de plástico con dientes de 1.5 cm de ancho se le hicieron los pozos para montar las muestras (5 pozos por gel).
- En tubos eppendoff de plástico de 0.5 ml, nuevos y estériles, se colocaron 2 perlas de cada muestra a clasificar, así como controles positivos (HM-1: IMSS) y negativos (bacteria sin amiba). Estos tubos siempre fueron mantenidos en hielo.

- Para la impregnación de las muestras, se usaron trozos de hilo crochet blanco No. 20 estéril de 1.5 cm de longitud, colocándose 2 trozos en cada muestra en cada uno de los pozos de los cuatro geles, con un tiempo máximo de 10 minutos en todo el proceso, para evitar degradación de las proteínas.
- Después de este proceso, los geles se encuentran listos para realizar el corrimiento electroforético.

Montaje del gel en la cámara de electroforesis

- Las cámaras para las enzimas ME y GPI fueron llenados los cuatro compartimientos con el amortiguador fosfato hasta cubrir los electrodos. Las cámaras para las enzimas HK y PGM los compartimientos centrales fueron llenados con amortiguador fosfato y los compartimientos laterales con amortiguador Tris/Maleato/EDTA/Mg₂Cl, previa colocación de algodón en los cuatro orificios que comunican los compartimientos.
- Fueron colocadas esponjas absorbentes gruesas de 23 cm por 20 cm con un extremo dentro de cada uno de los compartimientos laterales.
- Se colocó la placa metálica circulante de agua, con plástico kleen pack en su superficie, para usar como aislante con la placa acrílico-cristal.
- Fue colocado la placa de acrílico-cristal con el gel de almidón de arroz y con las muestras ya montadas.
- El otro extremo libre de las esponjas absorbentes, fueron colocadas en cada uno de los extremos del gel de almidón de arroz para formar el puente eléctrico.

- Es colocada una placa de cristal de 20 cm por 20 cm de diámetro y 3 mm de grosor sobre ambos extremos de las esponjas para lograr un buen contacto entre estas y el gel de almidón de arroz, así como para evitar la evaporación y deshidratación del gel.
- Las placas metálicas circulantes de agua fueron conectadas a un reciclador de agua, manteniendo esta última entre 4-8 °C para evitar calentamiento del gel.
- Las cámaras fueron conectadas a una fuente de poder eléctrica y fueron corridas durante 3 horas a 200 volts, 70 miliamperes y con una diferencia de 16 volts.

Tinción de los geles de almidón de arroz

- Se realizó una tinción diferente para cada una de las diferentes enzimas; las mezclas fueron hechas en vasos de precipitados de 100 ml, los cuales se cubrieron de la luz con papel carbón; las mezclas fueron hechas 30 minutos antes de finalizar el corrimiento electroforético y colocada en el gel con ayuda de un marco de acrílico de 15 cm por 12 cm y 8 mm de grosor (fijado con grapas de presión) y distribuida uniformemente con movimientos de inclinación. Las mezclas de tinción usadas fueron las siguientes:
 - a) Enzima Hexoquinasa (HK): Tris/Ácido clorhídrico (T/HCL) 0.3 M, pH 8.0 (7 ml), Cloruro de magnesio (MgCl₂) 1.0 M (200 ul), B-Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (NADP) 10 mg/ml (500 ul), Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) 100 UI/ml (200 ul), Glucosa 400 mg/ml (100 ul), Adenosin 5' Trifosfato (ATP) (15 mg), Azul de Tiazol (MTT) (5 mg), Metosulfato de Fenazina (PMS) (1 mg), y Agar purificado al 1.2% (10 ml).

- b) Enzima Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI): T/HCl 0.3 M, pH 8.0 (7 ml), MgCl₂ 1.0M (200 ul), NADP 10 mg/ml (500 ul), G-6-PD 100 UI/ml (500 ul), Fructuosa-6-Fosfato 10 mg/ml (200 ul), MTT (5 mg), PMS (1 mg), y Agar purificado al 1.2% (10 ml).
- c) Enzima Mállica (ME): T/HCl 0.3 M, pH 7.4 (7 ml), MgCl₂ 1.0 M (200 ul), NADP 10 mg/ml (500 ul), Malato de sodio 1.0 M (100 ul), MTT (5 mg), PMS (1 mg), y Agar purificado al 1.2% (10 ml).
- d) Enzima Fosfoglucomutasa (PGM): T/HCL 0.3 M, pH 8.0 (7 ml), MgCl₂ 1.0 M (200 ul), NADP 10 mg/ml (500 ul), G-6-PD 100 UI/ml (700 ul), Glucosa-1-Fosfato 25 mg/ml (500 ul), MTT (5 mg), PMS (1 mg), y Agar al 1.2% (10 ml).
- El gel de almidón de arroz junto con la mezcla de tinción fue colocada a 37 °C durante 30-60 minutos para lograr el revelado de las bandas.
 - El gel ya teñido y con el revelado de bandas fue fotografiado para evidencia permanente.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Extracción de ADN de materia fecal

Realizado según Romero y cols. (14, 15).

- Cinco a 10 gr de materia fecal fueron centrifugados a 1,500 rpm por 15 minutos 2X con 25 ml de cloruro de sodio (PBS) 1M y un tercer centrifugado con PBS-Tris/EDTA 1:1 (200 mM c/u); en todos los casos se decantó el sobrenadante y se conservó el botón, el cual finalmente se suspendió en 5 ml de Tris-EDTA 1:1 (200 mM c/u).
- De la suspensión anterior se tomaron 2 ml y fueron sometidos a nitrógeno líquido (-196 °C) por 15 minutos y bruscamente pasados a baño maría a 37 °C por 15 minutos, ambos pasos por 3X.
- Del tubo anterior se tomaron 200 ul en un tubo eppendorf nuevo, agregando además 20 ul de SDS 10%, 20 ul de EDTA 500mM y 10 ul de proteinasa K (20 mg/ml) y fueron incubados a baño maría a 50 °C por 2 horas; posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm por 5 minutos 1X, se tomó el sobrenadante en un nuevo tubo y se desechó el botón.
- El sobrenadante anterior (aproximadamente 250 ul) fue mezclado con un volumen de feno-cloroformo 1:1, homogeneizado por 5 segundos, y centrifugado a 15,000 rpm por 15 minutos 1X; se tomó la fase superior acuosa y colocada en un nuevo tubo.
- El producto anterior es mezclado con 25 ul de acetato de sodio 3M (AcNa), 1 ul de glicógeno y 2 volúmenes de etanol absoluto (500 ul) y se colocó a -20 °C

por 12 horas o 30 minutos a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; después fue centrifugado a 15,000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó el botón.

- El botón anterior fue lavado con etanol al 70% y centrifugado nuevamente como el paso anterior y secado al aire y resuspendido en 50 μl de Tris-EDTA (TE).
- A través de una columna elutipip fueron pasados con jeringa y un filtro de 0.22 micras, 3 ml de solución alta en sal (NaCl 4 M, EDTA 500 mM, Tris 500 mM), posteriormente 3 ml de solución baja en sal (NaCl 1M, EDTA 500 mM, Tris 500 mM), se retiró el filtro y se pasaron los 50 μl de producto obtenido en el paso anterior, se colocó el filtro y se pasó nuevamente 3 ml de solución baja en sal, seguido de 400 μl de suspensión alta en sal y recolectado en un nuevo tubo eppendorf; todos los procesos de elusión fueron realizados lentamente (1-2 gotas/segundo).
- El producto del paso anterior fue mezclado nuevamente con 50 μl de NaAc 3M, 1 μl de glicógeno, y 2 volúmenes de etanol absoluto (1,000 μl), homogeneizado por 10 segundos y se colocó durante 12 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 30 minutos a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; posteriormente fue centrifugado, descartado el sobrenadante y el botón secado al aire y finalmente resuspendido en 40 μl de TE.
- Del producto anterior se toman 2 μl para cada reacción de PCR.

Reacción en cadena

- En un mismo tubo plástico nuevo y estéril de 0.5 ml son mezclados: 10 ul de buffer para PCR (10 X), 10 ul de trifosfatos deoxiribonucleosidos (dNTPs) (10 X), 0.5 ul de enzima taq-polimerasa, 1 ul de cada primer específico (400-500 ng/ul), 2 ul de ADN blanco y 75.5 ul de agua desionizada estéril para un volumen final total de 100 ul por tubo; esta mezcla es cubierta con 2 gotas de aceite mineral para evitar evaporación.
- Las condiciones estándar utilizadas para la reacción de PCR fueron: denaturación a 94 °C por 45 segundos, alineación 55 °C por 60 segundos y síntesis a 72 °C por 45 segundos realizándose 35 ciclos; el proceso fue realizado en una máquina automática termocicladora Perkin Elmer Cetus (14, 15).
- Los primers específicos para las cepas patógenas (145 pb) usados fueron: EHP1= TCAA AATG GTCG TCGT CTAG GC y EHP2= CAGT TAGA AATT ATTG TACT TTGT A y para las cepas no patógenas (133 pb): EHNP1= GGAT CCTC CAAA AAAT AAAG T y EHNP2= CCAC AGAA CGAT ATTG GATA CC.
- Durante el proceso de amplificación por PCR (duración aproximada de 3 horas) se realizó un gel de agarosa al 2.5% y 100 mM de Tris/Borato/EDTA (TBE) con 10 pozos para la colocación de la muestra.
- Al obtener los productos de PCR, fueron colocados 8 ul en un pozo de cada una de las muestras y teñidos con 2 ul de azul de bromotimol; fueron también

colocados control positivo (HM-1:IMSS) y control negativo (sin ADN), así como un estándar de 100 pares de bases.

- El gel de agarosa con las muestras montadas, es corrido electroforéticamente por 90 minutos a 110 volts con una fuente de poder eléctrica (Hoefer Scientific Instrument) y usando como amortiguador de corrimiento TBE (1 M), el cual cubre totalmente al gel de agarosa.
- Al finalizar el corrimiento electroforético, el gel fue teñido con bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos y observado en una cámara de luz ultravioleta para la visualización de las bandas.
- El gel fue fotografiado para evidencia visual permanente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las estandarizaciones de las técnicas de microscopia de luz, cultivo monoxénico de Robinson, electroforesis de isoenzimas y reacción en cadena de la polimerasa fueron analizadas por kappa no ponderada con la siguiente formula (70):

$$k = \frac{O - C}{1 - C}$$

donde: **k** = kappa no ponderada
 O = Concordancia observada
 C = Concordancia por probabilidad

RESULTADOS

La investigación fue realizada durante el período de Abril de 1994 a Junio de 1996 (total de 26 meses); durante los primeros 16 meses se realizó la recolección de las muestras, las examinaciones por microscopia de luz, el cultivo de Robinson y la estandarización de éstas dos últimas técnicas, lizado de trofozoitos y su almacenamiento en nitrógeno líquido y extracción de ADN de la materia fecal. Durante los restantes 10 meses se realizaron la electroforesis de isoenzimas y la reacción en cadena de la polimerasa, así como la estandarización de ambos métodos.

Fue iniciada la recolección de los centros CSMN y HGM con un total inicial de 70 muestras clínicas, las cuales fueron verificadas en el HIMFG encontrando una concordancia de 0.23; frente a éste resultado se comentó con los dos centros para mayor acuciosidad y por lo cual se realizó una segunda etapa con un total de 115 muestras clínicas y se encontró una concordancia de 0.28.

Frente a los problemas de la pobre concordancia que encontramos y verificando que el 90% de las muestras correspondían al centro de recolección CSMN se planteó como objetivo incrementar la eficacia en la identificación correcta por lo que se decidió dar al técnico microscopista de ese centro un curso teórico-práctico en microscopia de luz para diagnóstico de parasitosis intestinales con duración de un mes y con sede en el centro HIMFG, logrando una concordancia inicial de 0.32 para *E. histolytica*/*E. dispar* y 0.45 para otras parasitosis (*Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, etc.) con 130 muestras, y una concordancia al final del adiestramiento de 0.92 para *E. histolytica*/*E. dispar* y 0.94 para otras parasitosis con un total de 1,230 muestras procesadas (kappa no ponderado) (Gráfica 1).

La capacitación para lograr el cultivo monoxénico de Robinson se desarrolló en dos etapas; en la primera se realizaron un total de 30 cultivos en los que no se logró crecimiento. Frente a éstos resultados se decidió en una segunda etapa la capacitación del alumno en la técnica del cultivo monoxénico de Robinson realizando un adiestramiento de 3 meses con asesoramiento de un experto en el cultivo y conservación de amiba en medio axénico y monoxénico (experiencia de 30 años), logrando una concordancia inicial de 0.36 y una al final de 1.00 con un total de 316 cultivos procesados (kappa no ponderado). Para lograr la estandarización de la técnica de zimodemos, fueron realizados experimentos de ensayo/error hasta lograr un patrón de bandas descritas de acuerdo a la bibliografía y supervisada por un experto en su interpretación (20 años de experiencia).

Para el desarrollo y estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, fue tomado un curso de Biología Molecular básico de 8 meses de duración y en supervisión con un Biólogo Molecular y experto en PCR, logrando una concordancia inicial de 0.24 y una al final de 1.00 con un total de 132 experimentos desarrollados (kappa no ponderado).

De los tres centros de captura se lograron recolectar un total de 2,560 muestras clínicas de materia fecal de pacientes que fueron diagnosticados por microscopia de luz como portadores de quistes y/o trofozoítos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. En el CSMN fueron recolectadas 2,261 muestras, en el HGM se recolectaron 221 muestras y en el HIMFG fueron 78 muestras recolectadas.

Con el objetivo de establecer una mayor seguridad en trabajar con muestras realmente positivas para *E. histolytica/E. dispar*, en la institución sede (HIMFG) fueron analizadas nuevamente el 71% (1,813) y el 29% (747) restante no fueron confirmadas

por problemas administrativos ajenos a la investigación. Del total de muestras confirmadas por segunda vez (duplicado) en el HIMFG, el 13% (238/1,813) fueron positivas para quistes y ninguna positiva para trofozoitos, de éstas muestras, se obtuvo crecimiento en medio de cultivo monoxénico de Robinson en el 27% (64/238) (Gráfica 2), siendo incluidas para el estudio de zimodemos únicamente el 25% (16/64) por cumplir con los criterios de inclusión, el restante 75% (48/64) fueron excluidos por no lograr el crecimiento mínimo de 50,000 trofozoitos/ml antes del punto de corte de subcultivos para realización de zimodemos (Gráfica 3).

De las 16 muestras a las cuales se les realizó electroforesis de isoenzimas (zimodemos), se obtuvieron 15 (94%) con patrón no patógeno (*E. dispar*), correspondiendo 12 a zimodemo I (75%), dos correspondieron a zimodemo XV (13%) y uno a zimodemo XVI (6%), y uno (6%) correspondió a un patrón patógeno (*E. histolytica*) con zimodemo II por presentar una banda alfa en la enzima Fosfoglucomutasa y una banda de migración rápida en la enzima Hexoquinasa (Gráficas 4 y 5, Cuadro 1). Fueron usados como patrón de referencia los corrimientos electroforéticos descritos por Sargeunt y cols en base al zimograma descrito (anexo 1). Como controles positivos se usaron lizados de trofozoitos de la cepa axénica HM-1:IMSS, la cual es usada como cepa de referencia de patogenicidad en la mayoría de los estudios y fue generosamente donada por el laboratorio del Dr. Armando Isibasi Araujo del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Como controles negativos verdaderos, fueron tomadas muestras clínicas de materia fecal negativas por microscopia de luz para *E. histolytica*/*E. dispar* y positivas para otras parasitosis (*Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Trichuris Trichura*, *Ascaris lumbricoides*), así como negativas para cualquier parásito, además de cultivos monoxénicos de Robinson

sin inoculación de materia fecal; todos estos controles negativos recibieron el mismo procesamiento que las muestras positivas para *E. histolytica/dispar* para la realización de los zimodemos.

Por lo que respecta a los experimentos de PCR, se obtuvo 15 muestras positivas para cepas no patógenas (*E. dispar*) usando la sonda de ADN de 133 pb específicas para éste tipo de cepa en donde quedó incluida la muestra que correspondió a cepa patógena (*E. histolytica*) por electroforesis (zimodemo II) y se obtuvo una muestra para cepa patógena (*E. histolytica*) usando el oligonucleotido de 145 pb específico para éstas cepas y el cual correspondió a zimodemo I no patógeno (*E. dispar*) por electroforesis (Gráfica 6, Cuadro 2). Como control positivo fue usado ADN de *E. histolytica* de la cepa control HM-1:IMSS, Como controles negativos se usó ADN de las mismas muestras clínicas utilizadas en los zimodemos como control negativo, recibiendo el mismo procesamiento que las que fueron positivas para *E. histolytica/E. dispar* por microscopia de luz.

DISCUSIÓN

Actualmente, la detección y diagnóstico de infecciones parasitarias se fundamenta en varios métodos sumado a síntomas clínicos, historia clínica, historia de viaje y localización geográfica del paciente. Cada una de las técnicas diagnosticas tiene ventajas y desventajas inherentes, independientemente del tipo de parásito o del espécimen clínico que esta siendo examinado. Las principales ventajas de las técnicas de detección basadas en ácidos nucleicos son su sensibilidad y especificidad para detectar patógenos y la velocidad a la cual pueden identificar un organismo específico (56, 58). Si el cultivo o inoculación animal son requeridos para la identificación del parásito y el inicio de terapéutica, entonces la detección basada en ADN, como la PCR, ofrece una ventaja, tal es el caso del diagnóstico de amibiasis intestinal y su diferenciación y por consecuencia la decisión de administrar tratamiento (16). Cuando la microscopia directa es suficiente para detección del parásito e identificación de especie por morfología, entonces la tecnología basada en ácidos nucleicos no es ventajosa, excepto para procesar un gran número de muestras con una técnica automatizada. Sin embargo, cuando la carga del parásito es baja, entonces una técnica diagnóstica sensible involucrando detección de ácidos nucleicos es beneficiosa. Otra ventaja de éstas técnicas es que no es necesario que el organismo este viable o sea cultivable, sólo se requiere conocer una secuencia genética específica del germen blanco (57).

Actualmente está ampliamente descrito que en la amibiasis intestinal, la microscopia de luz no permite realizar la diferenciación entre ambos tipos de cepa (53, 71, 72), requisito indispensable en la actualidad para decidir la instalación de tratamiento

según recomendaciones de la OMS (16) y considerando que dentro de los factores de riesgo más importantes se encuentra la mala higiene y la pobreza (1), son todos estos factores importantes en donde en nuestra investigación en el CSMN (recolección de la mayoría de las muestras clínicas), en donde existe un alto índice de pobreza y mal saneamiento ambiental se utiliza la microscopia de luz para realizar el diagnóstico y decidir la administración de tratamiento, una técnica que en la actualidad no está aceptada y en donde encontramos que el personal responsable del diagnóstico no tiene la experiencia suficiente y como consecuencia requiere una mayor atención por los responsables de ésta área.

Entre los múltiples métodos diagnósticos que usan como materia prima el ADN, el de mayor aplicabilidad clínica tal vez sea la reacción en cadena de la polimerasa, basado en su alta sensibilidad y especificidad, demostrada en diferentes entidades nosológicas, en la necesidad de la presencia de una sola molécula de ADN para lograr una multiplicación geométrica del segmento de ADN deseado y su posterior secuenciación sin necesidad de la clonación, la importancia mínima de la presencia de ADN de otros organismos aún en cantidad mucho mayor que el ADN blanco (56, 58, 59).

La PCR ha sido usada para identificar desordenes genéticos tales como la Distrofia muscular de Duchenne, determinación prenatal del sexo amplificando segmentos específicos del cromosoma Y, ha creado ventajas en la tipificación del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) en comparación con los métodos tradicionales de haplotipificación. En lo que respecta a enfermedades infecciosas, la PCR ha demostrado su utilidad, con identificación viral a nivel de orina, sangre periférica, tejidos de necropsia de piel, pulmón, nódulos linfáticos, hígado y células cervicales; se

ha identificado micobacterias en espectoración, material de aspirado gástrico y de abscesos y nódulos linfáticos (62-68).

En lo que respecta al diagnóstico de infección intestinal por amiba y su posterior caracterización requiere en un principio de la necesidad de cultivar la materia fecal en medio monoxénico, el cual es selectivo multifactorialmente para determinado número de cepas (retraso en procesamiento de muestras, terapia antiamebiana previa, etc), debido a que se logra una eficacia máxima de 35-50%, lo cual sucedió en nuestro estudio en donde tuvimos una eficacia de cultivo positivo del 27% (64/238), por lo cual perdemos la posibilidad de detectar y por ende clasificar a la mitad de las cepas presentes (52, 53). Posterior al aislamiento en cultivo, es necesario realizar la electroforesis de isoenzimas glicolíticas para lograr su clasificación en *E. histolytica*/*E. dispar*, lo cual no se logra en el 100% de los casos debido a que la cosecha en los cultivos no es con la cantidad suficiente de trofozoítos, igual que como sucedió en la investigación en donde sólo logramos cosecha suficiente en el 25% (16/64), y por lo tanto no permite identificar su zimodemo debido a la cantidad insuficiente de isoenzimas, por lo cual, sumado a los problemas que presenta en la eficacia del cultivo nos impide clasificar a un número considerable de cepas, resultando como consecuencia en que se trata de un método caro, con un consumo de tiempo grande, ya que en nuestra investigación y en el mejor de los casos se consumió 10 días para realizar el cultivo y la clasificación por zimodemo, requiere además gran experiencia por parte de los técnicos de laboratorio, traducido en que se trata de un método no aplicable a laboratorios de rutina y mucho menos con aplicabilidad epidemiológica considerando la gran cantidad de muestras que se requieren procesar en este tipo de estudio.

Las evidencias abrumadoras de la existencia de dos diferentes cepas de *Entamoeba*, una patógena llamada *E. histolytica* y una no patógena llamada *E. Dispar*, fueron fundamentales para que en el XIII Seminario de Amibiasis realizado en México en enero de 1997 se llegara al consenso general de llamar formalmente a la cepa productora de enfermedad *Entamoeba histolytica* y a la incapaz de producir enfermedad clínica *Entamoeba dispar*, nomenclatura que se venía utilizando desde hace varios años en la literatura mundial, considerando que Brump desde 1925 estableció ésta diferenciación basado en la observación clínica (8, 16).

Ante ésta caracterización del parásito productor de la amibiasis, se inició con el desarrollo de métodos de diagnóstico que nos permitieran establecer ésta diferencia de cepas, basados inicialmente a partir de trofozoítos cultivados en medios monoxénicos, los cuales tienen la característica de tener asociada una bacteria al cultivo para favorecer su desarrollo (*Escherichia coli*), estableciendo una primera diferenciación bioquímica por Sargeant y Williams por medio de la velocidad de corrimiento electroforético de las isoenzimas glicolíticas GPI, PGM, ME y HK, estableciendo como cepas patógenas a las que fueron aisladas de pacientes con sintomatología clínica y cepas no patógenas a aquellas que se aislaron de pacientes totalmente asintomáticos, actualmente llamadas *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente, estableciendo una correlación positiva en un gran número de cepas a través de los años (9, 10), en nuestra investigación se logró la caracterización de las cepas que se obtuvo crecimiento suficiente de trofozoítos a través de este método, en donde la gran mayoría (94%) correspondieron a cepas no patógenas, lo cual coincide con la presentación clínica de no producción de enfermedad (1, 5, 6); en contraparte a éste método de caracterización, en 1986 Mirelman y cols. publicaron que durante la

axenización de una cepa no patógena, presentó conversión a patrón patógeno usando el mismo método electroforético (30), por lo cual un año después Sargeant publicó la confiabilidad de su método basado en más de 10,000 aislados del parásito de varias partes del mundo (23). De manera interesante, algunos grupos de investigadores, incluyendo aquellos que originalmente reportaron la conversión, no lograron la reproducción del fenómeno usando el material y métodos descritos.

A partir de ésta diferenciación bioquímica y el advenimiento de la Biología Molecular se desarrollaron muchos métodos inmunológicos y genéticos para el diagnóstico y caracterización de las cepas de *Entamoeba*, con lo que en 1989 Tannich y cols. establecieron diferencias substanciales en el ADN genómico de éstos parásitos (37), posteriormente esto fue confirmado y ampliada ésta diferenciación cuando Clark y Diamond reportaron la distancia genética del ARNr entre éstos dos organismos comparada con la distancia entre el ARNr del humano y el ratón (34, 35). Así mismo, en la aplicación de la PCR directamente en materia fecal para el diagnóstico de amebiasis, Romero y Acuna usando las mismas sondas de ADN reportaron poblaciones mixtas de cepas, pero con un franco predominio de cepas patógenas (14, 15), a diferencia de nuestros resultados en donde, nuevamente fueron aplicadas estas mismas sondas de ADN y encontramos que el 94% (15/16) correspondió a cepas no patógenas exclusivamente, sin encontrar poblaciones mixtas. Debemos considerar que estas sondas se obtuvieron de secuencias altamente repetitivas en la región no codificante del gene ARNr, lo cual explicaría la gran población mixta encontrada en los estudios de Romero y Acuña, no así los encontrados en el nuestro, en donde llama la atención que cuando comparamos la población de cepas estudiadas por ambos métodos (PCR y zimodemos), existe un cruce en los resultados de las que fueron

identificadas como patógenas, ya que no se trató de la misma cepa, en donde considerando la sensibilidad y especificidad de la PCR, esto es factible que sucediera al tener una infección mixta, aunque no se puede asegurar esto, debido a que es necesario manejar la reproducibilidad con esta población de cepas. Entre ambos métodos existe una concordancia importante del 93.75%, considerando que la muestra es muy pequeña existe diferencia en cuanto a poblaciones mixtas usando la misma técnica (PCR) y los mismos oligonucleotidos que las utilizadas por Romero y Acuña pudiendo tener como explicación el hecho que fueron diseñadas de repeticiones altamente repetitivas de regiones no codificantes del gene ARNr.

CONCLUSIONES

La microscopía de luz es una técnica que no debería ser utilizada para el diagnóstico de amibiasis intestinal y la decisión de tratamiento, debido a que es poco sensible, incapaz de diferenciar amiba patógena de no patógena y con fácil interpretación de resultados falsos positivos (53). Así mismo, el requisito indispensable para el uso de esta técnica debe ser la capacitación adecuada del personal responsable del diagnóstico, sobre todo en el primer nivel de atención, que es en donde existe mayor problema en esta área.

La eficacia pobre de lograr un cultivo positivo en medio de Robinson, se confirma que es baja, ya que solamente el 27% de las muestras procesadas por duplicado como positivas se logró obtener crecimiento de la amiba, lo que nos traduce la selectividad del medio o de características inherentes a las cepas, así como de factores externos que no permite un óptimo crecimiento, siendo esta una limitante para que los zimodemos sean considerados como una alternativa en laboratorios de rutina para el diagnóstico de amibiasis intestinal, aun más, basados en que del total de cultivos positivos únicamente en el 25% (16/64) se logró un crecimiento suficiente de trofozoítos para lograr realizar los zimodemos.

En cuanto a los resultados obtenidos por zimodemos, encontramos que la gran mayoría corresponde a no patógenos (94%) y únicamente el 6.5% a patógenos, lo cual refleja la presentación clínica y epidemiológica de la amibiasis intestinal, en donde el 90% de los pacientes son asintomáticos y el 10% presentan síntomas de enfermedad en grado variable. De la misma manera, al ser aplicada la PCR, encontramos que, nuevamente, el 94% correspondió a cepas no patógenas y el 6.5% a cepas patógenas. Estos resultados son totalmente diferentes a las poblaciones mixtas reportadas por

Romero y cols, así como Acuña y cols usando los mismo oligonucleotidos, lo cual nos establece que la reproducibilidad es variable, aun usando los mismos material y métodos.

Desde luego que llama la atención que la cepa que se identificó como cepa patógena por zimodemo, al aplicarle PCR correspondió a cepa no patógena y lo mismo con la cepa que se identificó como patógena por PCR en el zimodemo correspondió a no patógena. En el intento de explicar estos resultados, el principal factor a considerar es el error en el procesamiento, el cual se puede salvar considerando que fueron realizados por duplicado; otro punto importante es considerar que las sondas usadas fueron diseñadas a partir de la región no codificante del gene ARNr, lo cual explicaría estos resultados cruzados.

Deberán realizarse estudios futuros usando estos mismos oligonucleotidos y tratar de evaluar la reproducibilidad, así como la validez interna y con su posterior evaluación de la validez externa.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Kretschmer R. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. México, México. Editorial Trillas 1994.
- 2.- Walsh J.A. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986;8:228-238.
- 3.- Gutiérrez G, Ludlow A, Espinosa G, Herrera S, Muñoz O, et al. National serologic survey. II Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico. In: Sepulveda B, Diamond LS, eds. Amebiasis. Mexico city: Instituto Mexicano del Seguro Social 1976;609-618.
- 4.- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J y cols. Seroepidemiology of Amebiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 1994;50:412-419.
- 5.- Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Cuarta edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana 1997, vol. 2:2688-2703.
- 6.- Feigin RD, Cherry JD. Textbook of pediatric infectious disease. Edition 4. Philadelphia, Pennsylvania, USA. W.B. Saunders Company 1998, vol. II:2389-2396.
- 7.- Bruckner DA. Amebiasis. Clin Microbiol Rev 1992;5:356-369.
- 8.- Cieslak PR, Stanley SL Jr. Advances in Amebiasis: implications for the clinician. Infect Dis Clin P 1992;1:151-157.

- 9.- Sargeant PG, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978;72:164-166.
- 10.- Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978;72:519-521.
- 11.- Sargeant PG, Williams JE, Kumate J, Jimenez E. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico city. A pilot survey I. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980;74:653-656.
- 12.- Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995;8:113-130.
- 13.- Haque R, Kress K, Wood S, Jackson TFHG, Lyerly D y cols. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the Galactose-specific adhesin. J Infect Dis 1993;167:247-249.
- 14.- Romero JL, Descoteaux S, Reed S, Orozco E, Santos J y cols. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. Archives of Medical Research 1992;23:277-279.
- 15.- Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F y cols. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 1993;48:58-70.
- 16.- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico city, Mexico, 28-29 January 1997. Epidemiol Bull 1997;18:13-14.

DATA TROPIC NO 5417
DE LA UNAM

- 17.- Gaucher D, Chadee K. Immunogenicity of an optimized *Entamoeba histolytica* Gal-Lectin DNA vaccine. *Archives of Medical Research* 2000; 31:S307-S308.
- 18.- Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL Jr. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 1994;62:1166-1170.
- 19.- Chu-Jins GS, Torian BE, Abd-Alla MD, Jackson TFHG, Gatharim V, et al. Protection of gerbils from liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun* 1995;63:472-477.
- 20.- Martínez-Palomo A, Martínez-Báez M. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. *Rev Infect Dis* 1983;5:1093-1102.
- 21.- Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans R Soc Med Hyg* 1968;62:285-294.
- 22.- Souza V, Eguiarte L, Avila G, Capello R, Gallardo C, et al. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1260-1268.
- 23.- Sargeant PG. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. *Parasitol Today* 1987;3:40-43.
- 24.- Sargeant PG. Zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today* 1987;3: 158.
- 25.- Strachan WD, Spice WM, Chiodini PL, Moody AH, Ackers JP. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1988;March 12:561-563.

- 26.- Reed SL. Amebiasis: an update. *C I D* 1992;14:385-393.
- 27.- Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, Kain KC. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting nonendemicity. *CID* 1999;29:1315-1318.
- 28.- Andrews J, Mentzoni L, Bjorvatn B. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Med Hyg* 1990;84:63-65.
- 29.- Mukherjee RM, Bhol KC, Mehra S, Maitra TK, Jalan KN. Zymodeme alteration of *Entamoeba histolytica* isolates under varying conditions. *Trans R Soc Med Hyg* 1993;87:490-491.
- 30.- Mirelman D, Bracha R, Wexler A, Chayan A. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infect Immun* 1986;54:827-832.
- 31.- Clark CG, Cunnick CC, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: is conversion of "nonpathogenic" amebae to the "pathogenic" form a real phenomenon?. *Exp Parasitol* 1992;74:307-314.
- 32.- Garfinkel LI, Giladi M, Huber M, Gitler C, Mirelman D, et al. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun* 1989;57:926-931.
- 33.- Bracha R, Diamond LS, Ackers JP, Burchard GD, Mirelman D. Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes, *J Clin Microbiol* 1990;28:680-684.

- 34.- Troll H, Marti H, Weiss N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. J Clin Microbiol 1997;35:1701-1705.
- 35.- Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol 1991;49:297-302.
- 36.- Cevallos MA, Porta H, Alagón AC, Lizardi PM. Sequence of the 5.8S ribosomal gene of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Nucleic Acids Res 1993;21:355.
- 37.- Tannich E, Bruchhaus I, Walter RD, Horstmann RD. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. Mol Biochem Parasitol 1991;49:61-72.
- 38.- Haque R, Neville LM, Wood S, Petri WA Jr. Short report: detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* directly in stool. J Trop Med Hyg 1994;50:595-596.
- 39.- Willhoeft U, Hamman L, Tannich E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. Infect Immun 1999;67:5925.
- 40.- Willhoeft U, Buss H, Tannich E. DNA sequences corresponding to the ariel gene family of *Entamoeba histolytica* are not present in *Entamoeba dispar*. Parasitol Res 1999;85:787.

- 41.- Willhoeft U, Buss H, Tannich E. Genetic differences between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 2000; 31:S254.
- 42.- Sargeant PG, Jackson TFHG, Wiffen S, Bhojnani R, Williams JE, et al. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. Arch Invest Med (Mex) 1987;18:69-75.
- 43.- Martínez-G MDC, Muñoz O, Garduño-R G, Sánchez-P MA, Valadez-S A, et al. Pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* in a rural area of Mexico. Concordance with serology. Arch Invest Med (Mex) 1990; 21(supl 1):147-152.
- 44.- Stanley SL Jr, Jackson TFHG, Reed SL, Calderon J, Kunz-Jenkins C, et al. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. JAMA 1991;266:1984-1986.
- 45.- Stanley SL Jr, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4976-4980.
- 46.- Osorio LM, Pico T, Luaces A. Circulating antibodies to histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*, in amoebic liver abscess patients. Parasitology 1992;105:207-210.
- 47.- Kaur S, Vohra H, Wangoo A, Ganguly NK, Mahajan RC. *Entamoeba histolytica*: identification of a major surface antigen in liver abscess pus using a monoclonal antibody. Trans R Soc Med Hyg 1993;87:489.
- 48.- Tachibana H, Kobayashi S, Kato Y, Nagakura K, Kaneda Y, et al. Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000-Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody. Infect Immun 1990;58:955-960.

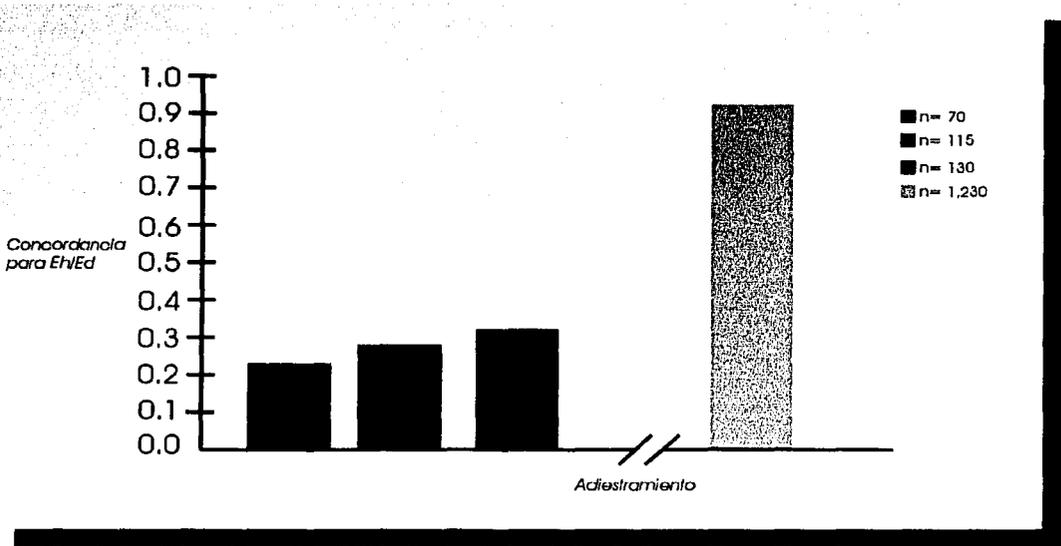
- 49.- Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, Kress K, Saffer LD y cols. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the Galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990;58:1802-1806.
- 50.- Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rehman T, Aguirre A, Jaramillo C y cols. A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2807-2813.
- 51.- 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.
- 52.- Sehgal R, Abd-Alla M, Moody AH, Chiodini PL, Ackers JP. Comparison of two media for the isolation and short-term culture of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:394.
- 53.- Haque R, Ali IKM, Akther S, Petri Jr WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:449-452.
- 54.- Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3337-3340.
- 55.- Smyth TN. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:58-72.
- 56.- Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990;322:178-183.

- 57.- Tompkins LS, Warford AL. DNA: nueva era en diagnóstico. Atención Médica 1993;Diciembre:35-42.
- 58.- Arnheim N, Erlich H. Polymerase chain reaction strategy. Annu Rev Biochem 1992;61:131-156.
- 59.- Markham AF. La reacción en cadena de la polimerasa: una herramienta para la medicina molecular. BMJ 1993;1:189-194.
- 60.- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989;339:237-238.
- 61.- Sweet-Cordero A, Santos-Preciado JI. Utilidad de la reacción en cadena con la polimerasa (PCR) en la investigación y el diagnóstico clínico en pediatría. Bol Med Hosp Infant Mex 1993;50:73-78.
- 62.- Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi R. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme-immunoassay. J Clin Microbiol 1990;28:1968-1973.
- 63.- Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:2847-2851.
- 64.- Troendle-Atkins J, Demmler GJ, Buffone GJ. Rapid diagnosis of herpes simplex virus encephalitis by using the polymerase chain reaction. J Pediatr 1993;123:376-380.
- 65.- Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Almera R, Fuentes M, et al. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the venezuelan amazon. Am J Trop Med Hyg 1994;50:169-180.

- 66.- Sexton DJ, Kanj SS, Wilson K, Corey GR, Hegarty BC, et al. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for rocky mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50:59-63.
- 67.- Kovacs A, Xu J, Rasheed S, Li XL, Kogan T, et al. Comparison of a rapid nonisotopic polymerase chain reaction assay with four commonly used methods for the early diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in neonates and children. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:948-954.
- 68.- Ferbas J, Kaplan HK, Hausner MA, Hultin LE, Matud JL, et al. Virus Burden in Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency virus (HIV) Infection Is a Determinant of Anti-HIV CD8+ Lymphocyte Activity. *JID* 1995;172 (August):329-339.
- 69.- Katzwinkel-W S, Loscher L, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:115-118.
- 70.- Downie NM, Heath RW. Métodos estadísticos aplicados. Quinta edición. México, México. Editorial Harla 1986.
- 71.- Britten D, Wilson SM, McNerney R, Moody A, Chiodini PL, Ackers JP. An improved colorimetric PCR-Based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *J Clin Microbiol* 1997;35:1108-1111.
- 72.- Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:916-921.

ANEXOS

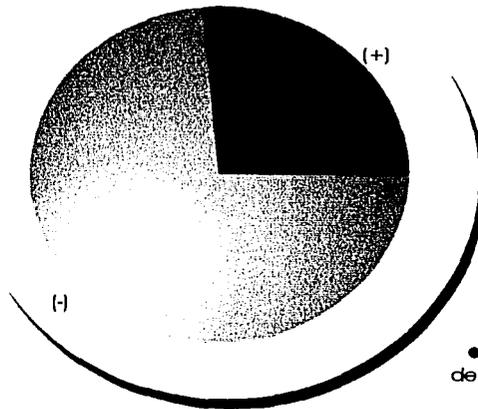
GRÁFICA 1



- Concordancia en el diagnóstico de *Eh/Ec* microscopía de luz en materia fecal antes y después de intervención.

GRÁFICA 2

- n= 238
- positivos= 64= 27%
 - negativos= 174= 73%

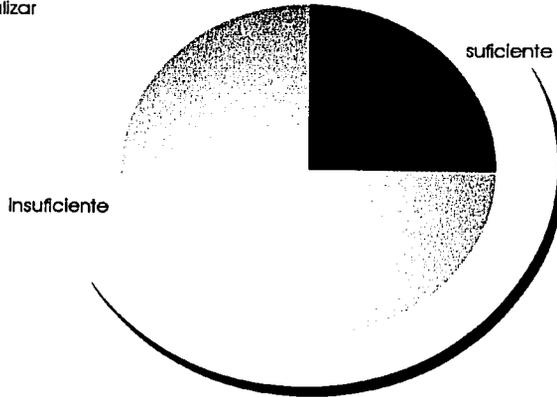


- Cultivo de Robinson por *Ec/Eh* de las muestras de materia fecal positivos por duplicado por microscopía de luz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 3

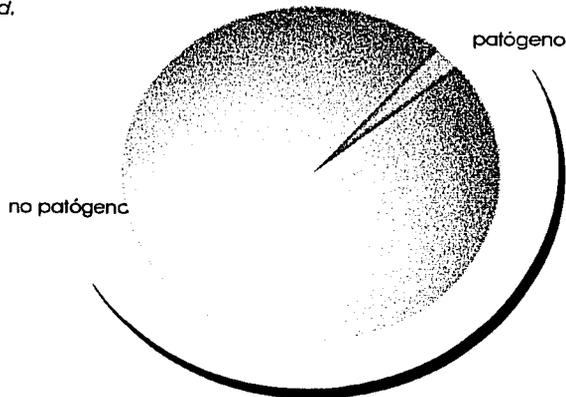
- Eficacia del cultivo Robinson para *Eh/Ed* con crecimiento suficiente para realizar zimodemos.



n= 64
● crecimiento suficiente = 16= 25%
◐ crecimiento insuficiente = 48= 75%

GRÁFICA 4

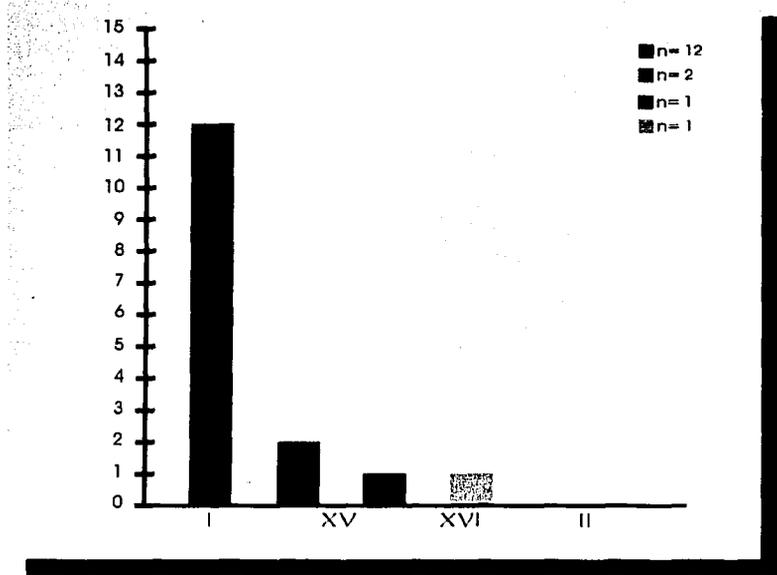
- Distribución por zimodemos de patogenicidad de las cepas obtenidos de *Eh/Ed*.



n= 16
◐ no patógeno = 15= 94%
● patógeno = 1= 6%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

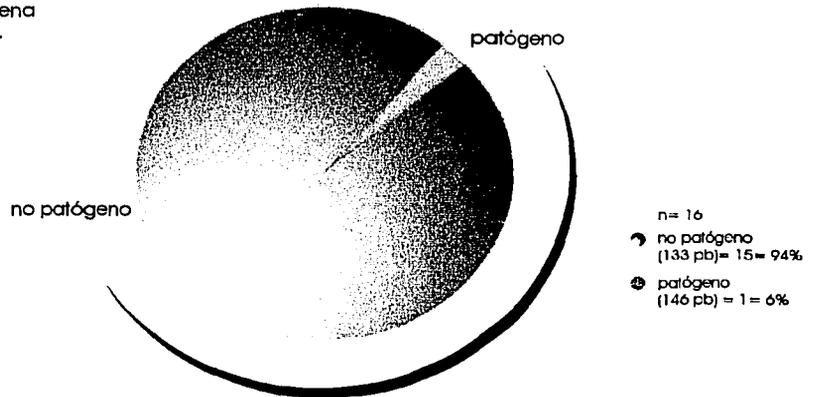
GRÁFICA 5



• Distribución de cepas *Eh/Ed* según la migración electroforética realizada. (N=16)

GRÁFICA 6

- Distribución de cepas de *Eh/Ed* por medio de reacción en cadena de la polimerasa.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 1

● Resultados de electroforesis de Isoenzimas (Zimodemos) de *Eh/Ed* y su clasificación.

	n	Clasificación
	12	No Patógeno
	1	Patógeno
	2	No Patógeno
	1	No Patógeno

CUADRO 2

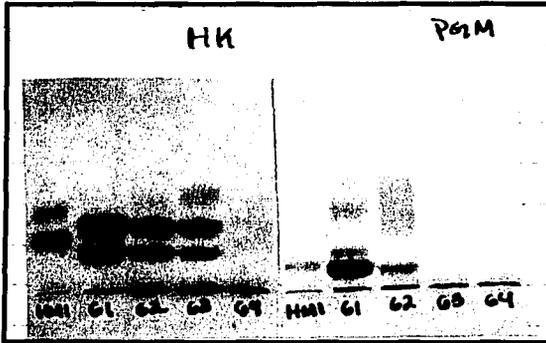
● Resultados de clasificación por PCR de muestras de materia fecal con *Entamoeba* por microscopía y cultivo.

PCR	n
NOGÉNA	1
PATÓGENA	15

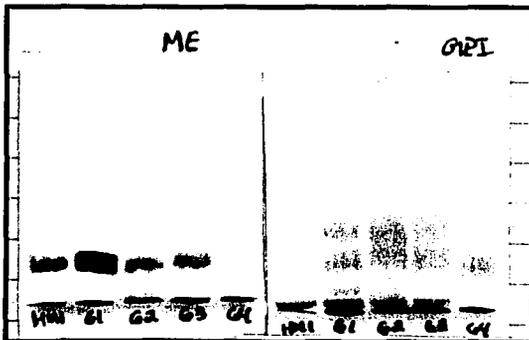
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Zimodemas de Entamoeba histolytica / dispar de las enzimas
HK, PGM, ME y GPI con corrimiento electroforético a 150 volts y 92 mA.

CUADRO 1



carril 1: HM1(control +)
carril 2: Muestra clinica
carril 3: muestra clinica
carril 4: muestra clinica
carril 5: control negativo

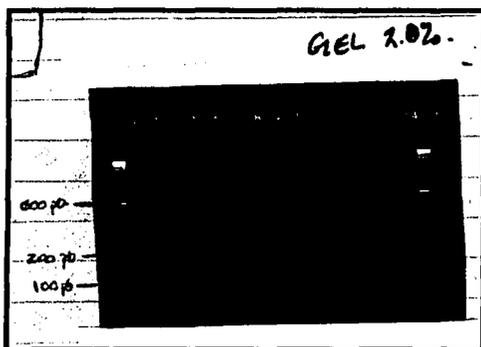


carril 1: HM1(control +)
carril 2: Muestra clinica
carril 3: muestra clinica
carril 4: muestra clinica
carril 5: control negativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

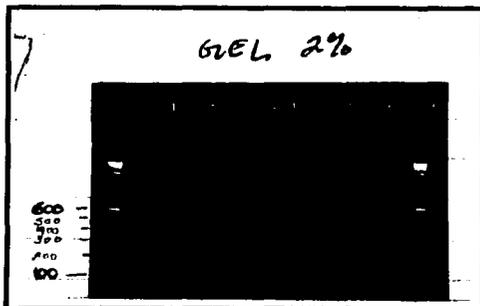
**PCR de materia fecal con oligonucleotidos patógenos
de Entamoeba histolytica (banda de 145 pb)**

CUADRO 2



- caril 1: stds 100 pb
- caril 2: muestra clinica
- caril 3: muestra clinica
- caril 4: muestra clinica
- caril 5: muestra clinica
- caril 6: muestra clinica
- caril 7: muestra clinica
- caril 8: muestra clinica
- caril 9: muestra clinica
- caril 10: muestra clinica
- caril 11: muestra clinica
- caril 12: muestra clinica
- caril 13: control + HM1
- caril 14: control negativo
- caril 15: stds 100 pb

**PCR de materia fecal con oligonucleotidos no patógenos
de Entamoeba dispar (banda de 133 pb)**



- caril 1: stds 100 pb
- caril 2: muestra clinica
- caril 3: muestra clinica
- caril 4: muestra clinica
- caril 5: muestra clinica
- caril 6: muestra clinica
- caril 7: muestra clinica
- caril 8: muestra clinica
- caril 9: muestra clinica
- caril 10: muestra clinica
- caril 11: muestra clinica
- caril 12: muestra clinica
- caril 13: control + HM1
- caril 14: control negativo
- caril 15: stds 100 pb

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Anexo I

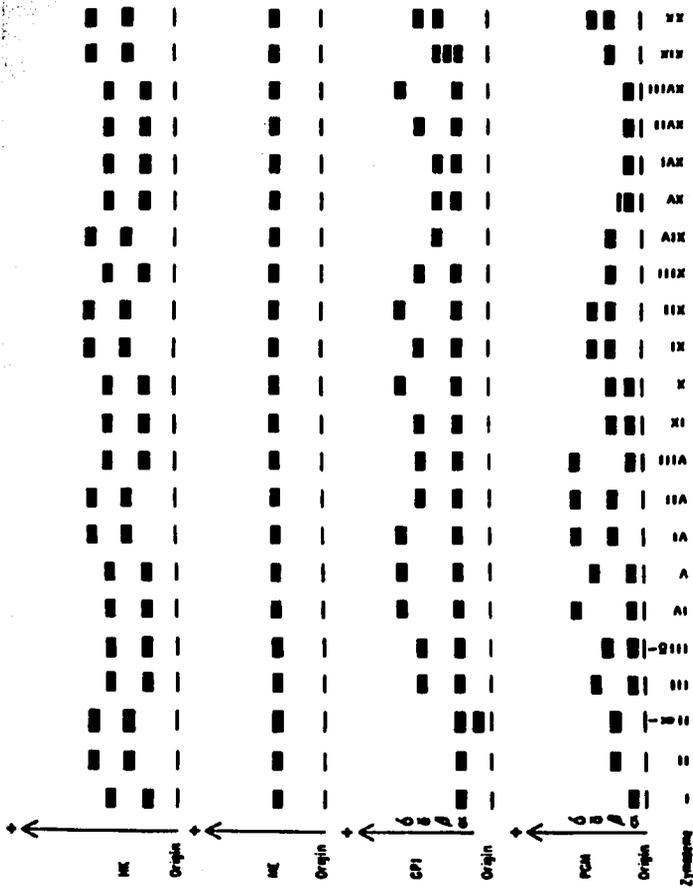


Figure 2. Transomes of *Escherichia coli* for phosphoglucosylase (PGM), glucose phosphate isomerase (CFI), L-malate:NADP⁺ oxidoreductase (MEI), and hexadecase (HK).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN