

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

**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE *E. HISTOLYTICA* Y *E. DISPAR*
EN INDIVIDUOS PORTADORES Y CON AMIBIASIS INVASORA A TRAVÉS
DEL ESTUDIO DE LOS GENES DE LA QUITINASA Y LA PROTEÍNA RICA
EN SERINA**

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

presenta:

M. en C. FERNANDO RAMOS REYES



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.

A Jimenita, Fery y Gabriela.

A mis padres: María del Socorro y Rodolfo (†).

A Nacho y Fito.

A mis tíos, primos y sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Ximénez por el apoyo, la motivación y los consejos brindados durante todo el tiempo que he trabajado en su laboratorio y en la realización de este proyecto.

A los Drs. Rogelio Alonso y Juan Pedro Laclette por la asesoría y los consejos proporcionados durante la realización de este trabajo.

A los Doctores: Ruy Pérez Montfort, Edda Sciutto Conde, Isaura Meza Gómez Palacio, Bertha Espinosa Gutierrez, Victor Tsutsumi Fujiyoshi y Rogelio Alonso Morales por haber aceptado fungir como sinodales y sus valiosas y acertadas observaciones sobre el trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio por su apoyo y ayuda.

CONTENIDO

	página
Contenido	6
Lista de Tablas y Figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Antecedentes	10
Objetivos	14
Hipótesis	15
Material y Métodos	16
Resultados	22
Discusión	42
Conclusiones	49
Bibliografía	50
Anexo I	57
Anexo II	63
Anexo III	67

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla		Pag
1	Iniciadores utilizados.	18
2	Prevalencia de <i>Eh</i> y <i>Ed</i> en Cuahuixtla determinado mediante ACP y PCR en muestras de heces.	22
3	Prevalencia de <i>Eh</i> y <i>Ed</i> en Casahuatlán determinado mediante el ACP y PCR en muestras de heces.	23
4	Resultados del Cultivo de Robinson.	24
5	Patrones de secuencias de aa del segmento polimórfico del gen CHI, en aislados de <i>Ed</i> provenientes de las comunidades de Casahuatlán y Cuahuixtla.	26
6	Patrones de restricción identificados en las comunidades de Cuahuixtla y Casahuatlán al amplificar el segmento polimórfico del gen SRP y su posterior digestión con <i>Alu I</i> .	28
7	Frecuencia de genotipos identificados en las 2 comunidades teniendo en cuenta los patrones de quitinasas y proteínas ricas en serina.	29
8	Agrupamiento de aislados de cultivo de Robinson con base en el genotipo.	30
9	Agrupamiento por familia de aislados de cultivo de Robinson.	31
10	Resultado de las amplificaciones realizadas con el ADN procedente de drenados hepáticos o pleurales de pacientes con abscesos hepáticos.	33

Figura		Pag
1	Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores RD, Psp y NPsp.	24
2	Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores CHI.	25
3	Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores SRPEd y el producto de digestión con la enzima <i>Alu I</i> .	27
4	Electroforesis de los amplificados obtenidos con el ADN de drenados hepáticos y los iniciadores RD y Psp.	34
5	Electroforesis de los de amplificados obtenidos con los iniciadores CHI y el ADN de drenados hepáticos.	35
6	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores CHIEh y el ADN de drenados hepáticos o drenados pleurales.	35
7	Alineamiento de la secuencia de aa de los segmentos polimórficos del gen CHI, procedente de drenado hepático o pleural de diferentes pacientes (A) y trofozoítos y quistes de portadores asintomáticos (B).	36
8	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores nSRPEh y el ADN de diferentes drenados hepáticos y pleurales (1).	37
9	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores nSRPEh y el ADN de diferentes drenados hepáticos y pleurales (2).	38
10	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores RD y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de <i>Eh</i> .	39
11	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores Psp y NPsp y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de <i>Eh</i> .	39
12	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores SRPEh y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de <i>Eh</i> .	40
13	Electroforesis de los amplificados obtenidos con los iniciadores CHI y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de <i>Eh</i> .	40

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina Sérica Bovina (Albumin from bovine serum)
°C	Grados centígrados
CHI	Quitinasa (Chitinase)
CPS	Coproparasitoscópico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<i>Ed</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
g	Fuerza centrífuga relativa
hrs	horas
min	minutos
mM	milimolar
M	molar
Neg	Negativo
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pH	potencial de Hidrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SRP	Proteína Rica en Serina (Serine Rich Protein)
SS	Solución salina
TBE	Tris-boratos-EDTA
U	Unidades enzimáticas
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar

RESUMEN

Se estudió la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en 2 comunidades muy cercanas entre si, en el estado de Morelos mediante microscopía y PCR. Por microscopía se encontró que la prevalencia de *Eh/Ed* en Casahuatlan fue del 14.5 %, mientras que en Cuahuixtla fue del 12.8%. Por PCR se encontró que la prevalencia de *E. histolytica* fue mayor que la de *E. dispar* en ambas comunidades: 32.6% en Casahuatlan y 13.8% en Cuahuixtla para *E. histolytica*, y 9.9% en Casahuatlan y 9.7% en Cuahuixtla para *E. dispar*; la prevalencia de infecciones mixtas (*E. histolytica* y *E. dispar*) fue del 4.5% en Casahuatlan y del 2.4% en Cuahuixtla.

Se estudió también el polimorfismo de los segmentos repetidos en serie de los genes que codifican para la quitinasa y la proteína rica en serina a partir de aislados en medio de cultivo de Robinson de *E. dispar* de ambas comunidades. Para el gen de la quitinasa, se identificaron 13 genotipos en 59 muestras analizadas mientras que para la proteína rica en serina se identificaron 34 patrones distintos en 67 muestras analizadas. De todas las muestras estudiadas (85) solamente en 50 fue posible caracterizar ambos marcadores (quitinasa y proteínas ricas en serina) lo que generó 33 genotipos distintos de los cuales, 8 se identificaron únicamente en Cuahuixtla y 23 únicamente en Casahuatlan; solo 2 genotipos se identificaron en ambas comunidades. Se muestra también en este trabajo la utilidad de estos marcadores en estudios epidemiológicos.

De igual forma se muestran los resultados del estudio del segmento repetido del gen de la quitinasa de *E. histolytica* obtenida de portadores asintomáticos así como de pacientes con absceso hepático amibiano. Tanto para *E. histolytica* como para *E. dispar*, se identificaron genotipos del gen de la quitinasa que no se habían reportado previamente. Nuestros resultados sugieren fuertemente que en algunos casos, la infección tanto por *E. histolytica* como por *E. dispar* puede ser policlonal.

ANTECEDENTES

Entamoeba histolytica, agente causal de la amibiasis en el humano, es un parásito que tiene un ciclo biológico muy sencillo, constituido por una forma quística que además de ser una forma de resistencia del parásito es la forma infectante, y el trofozoíto que es la forma móvil del parásito con capacidad de colonizar y en algunos casos invadir la mucosa intestinal u otros órganos del huésped. La infección ocurre por ingerir agua y/o alimentos contaminados con quistes del parásito que a su paso por el intestino desenquistan y colonizan la mucosa intestinal en el colon. Por mecanismos todavía no bien entendidos, los trofozoítos pueden transformarse en quistes y ser excretados con las heces, completando de esta forma el ciclo biológico. Por mucho tiempo *E. histolytica* fue considerada como un organismo primitivo por carecer de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico bien definido y poseer un metabolismo energético similar al de las bacterias. Sin embargo, estudios mas recientes sugieren que la falta de mitocondrias fue un fenómeno secundario [46, 72] y su localización filogenética varía dependiendo de los genes que se utilicen para su análisis [9, 18]. Seguramente su clasificación taxonómica irá cambiando en la medida que se tengan más datos genéticos del parásito, pero lo que queda claro es que su clasificación basada en criterios meramente morfológicos es obsoleta.

A pesar de no contar con datos recientes, la amibiasis se sigue considerando como una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el humano a nivel mundial [49, 69]. En México, de acuerdo a un estudio seroepidemiológico relativamente reciente, se encontró que el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amiba, lo que demuestra la alta frecuencia del parásito en nuestro medio [14]. Actualmente, se sabe que existen 2 tipos de amiba que morfológicamente son indistinguibles pero que por métodos bioquímicos [11], inmunológicos [53, 56] y del análisis de sus ADNs [30, 65, 69], se ha comprobado que son 2 especies diferentes; baste decir que la distancia genética entre los genes que codifican para la subunidad pequeña del ARN ribosomal de estos 2 organismos, es comparable a la que se encuentra entre el humano y el ratón [21]. Estas 2 especies distintas son: *Entamoeba histolytica* agente etiológico de la amibiasis y

Entamoeba dispar que no se ha asociado con procesos de daño tisular ni de invasión y se considera como un microorganismo comensal en el tubo digestivo del humano [17, 76]. Esta nueva clasificación ha hecho necesario revalorar los estudios sobre epidemiología de la amibiasis que no consideraban la existencia de estas 2 especies de amibas y ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que permiten distinguirlas [70].

Desde hace varios años se han hecho estudios sobre el genoma de *E. histolytica* lo que permitió determinar que sus cromosomas no se condensan en la forma típica y que su tamaño varía de 0.3 a 2.2 Mb, aunque se han reportado diferencias en el tamaño de cromosomas homólogos a partir de distintos aislados [77]. De igual forma se determinó que el parásito posee un genoma haploide de aproximadamente 20 Mb [10]. Sin embargo, existe incertidumbre sobre su ploidía y por lo tanto del número exacto de sus cromosomas. Recientemente se concluyó con la secuenciación del genoma de *E. histolytica* que es un avance importante en el conocimiento de este parásito [44]. El proyecto del genoma de la amiba ha permitido conocer entre otras cosas, que su genoma está constituido por 9938 genes con un tamaño promedio de 1.17 Kb, que solo el 25% de los genes contiene intrones y que solo una cuarta parte de éstos son múltiples. El conocimiento del genoma de *E. histolytica* abre nuevos campos para el estudio de este parásito [26, 71].

De igual forma, se han hecho estudios para determinar los mecanismos que utiliza el parásito para invadir y causar daño tisular en el huésped; sin embargo, a pesar de que se ha progresado mucho en este sentido, todavía no se conocen con precisión los mecanismos y el desarrollo de los eventos que ocurren desde la colonización hasta la producción de necrosis tisular como en el caso del absceso hepático amibiano [1, 45].

Algo que ha llamado la atención desde hace mucho tiempo es el hecho de que no todos los individuos que se infectan con *E. histolytica* desarrollan la enfermedad. En la primera mitad del siglo XX Brumpt hizo esta observación y propuso la existencia de 2 tipos de amiba una de las cuales era patógena y la otra no; su propuesta fue muy cuestionada en su época y no tuvo los medios tecnológicos para probarla [28]. Con el paso del tiempo y la obtención de información procedente de la investigación en torno a la amibiasis, se demostró que su hipótesis sobre la existencia de 2 tipos de amibas morfológicamente

indistinguibles era real y que se trataba en realidad de 2 especies distintas: *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amibiasis y *Entamoeba dispar*, parásito comensal del tubo digestivo [28]. Aparentemente este hecho explicaba el porqué un gran número de personas clasificadas como portadoras de amibas no desarrollaban la enfermedad. Sin embargo, aún después de que se utilizaron métodos que podían distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar*, se continuó observando que no todas las personas infectadas con *E. histolytica* desarrollan la enfermedad [2, 48], lo que sugería que factores aún no bien identificados, tanto del huésped como del parásito, podrían estar involucrados en la evolución de la infección parasitaria hacia un proceso invasor.

Con relación al huésped, Pérez-Rodríguez y col. [51] observaron una asociación entre el alelo HLA-DR3 y el complotipo SC01 con una mayor frecuencia de abscesos hepáticos amibianos en una población de niños mexicanos. En cambio, Duggal y col. [29] en un estudio realizado en Bangladesh observaron una asociación protectora entre el alelo DQB1-0601 y la infección por *E. histolytica*. Por su parte Padilla-Vaca y col. [50] observaron que la adherencia y el efecto citopático de *E. histolytica* se veía modificado por la cepa bacteriana con la que estaba en contacto el parásito y por lo tanto concluyeron que la flora del tubo digestivo del huésped podría influir sobre la virulencia del parásito. Sin embargo, todavía no se ha podido comprobar que algún factor del huésped esté involucrado en la resistencia o susceptibilidad a alguna de las formas de la enfermedad.

Al igual que como ocurre con otros agentes infecciosos, se considera que dentro de *E. histolytica* deben de existir cepas con diferente virulencia, lo cual explicaría porqué no todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad. Hasta el momento en *E. histolytica* no se han identificado microsátélites los cuales son secuencias repetidas en el ADN de algunos organismos que se han utilizado para la identificación de individuos dentro de una población. Sin embargo, sí se han identificado otro tipo de segmentos repetidos como los que se encuentran dentro de los genes que codifican para la quitinasa [27] y la proteína rica en serina [63] ó el gen específico de especie [13], que han mostrado ser de utilidad en la identificación de variantes dentro de *E. histolytica* y *E. dispar* [23, 33]. Por su parte Clark y col. [20] encontraron que asociados a los genes que codifican para los ARN de transferencia se encuentran algunos segmentos cortos repetidos en serie que también son de utilidad en la identificación de variantes en *E.*

histolytica y *E. dispar*. En la actualidad existen ya algunos reportes enfocados a la búsqueda de asociaciones entre los distintos marcadores que permiten identificar variantes en *E. histolytica* y las características de la infección; es decir, si la infección es asintomática o se trata de un proceso invasor intestinal o extraintestinal [8, 4, 35]. Sin embargo, los resultados publicados hasta el momento todavía no son concluyentes.

En México, después del trabajo de Acuña en 1993 en una pequeña comunidad del estado de Chiapas [2] y del de Newton en 1997 con 48 niños en el Hospital Infantil de México [48], no se han realizado otros trabajos que determinen la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en la población. Dada la extensión del territorio mexicano, la diversidad de sus ecosistemas, la diversidad genética y socioeconómica de sus habitantes y la variación en los índices de morbilidad por *E. histolytica* en los diferentes estados de la república, resulta importante conocer la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en las diferentes regiones del país para comprender mejor a la epidemiología de la amibiasis. De igual forma, tampoco existen trabajos que identifiquen y caractericen las variantes de *E. histolytica* y *E. dispar* que predominan en nuestro país, lo que nos permitiría compararlas entre sí, así como con lo reportado en otras partes de mundo, lo cual, de nueva cuenta, nos permitiría entender mejor la epidemiología de la enfermedad.

En este trabajo mostramos los resultados del estudio de la prevalencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en 2 comunidades del estado de Morelos, así como la genotipificación de las cepas de *E. dispar* identificadas y su posible uso en estudios epidemiológicos. De igual forma presentamos los resultados parciales sobre la tipificación de algunas cepas de *E. histolytica* obtenidas de portadores asintomáticos y personas con amibiasis hepática.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la prevalencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en 2 comunidades muy próximas entre sí en el estado de Morelos y determinar el(los) genotipo(s) de las cepas identificadas, así como el de cepas de *Entamoeba histolytica* responsables de procesos invasores.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar los grupos de estudio
 - Portadores asintomáticos
 - Pacientes con procesos invasivos

- Obtener el material biológico para la identificación, aislamiento y/o caracterización del parásito

- Tipificar el parásito analizando los genes CHI y SRP

- Determinar la posible utilidad de estos marcadores en estudios epidemiológicos

- Correlacionar los genotipos identificados con las características clínicas de la enfermedad

HIPÓTESIS

Las diferentes formas clínicas de la infección por *Entamoeba histolytica* se deben a la existencia de variantes del parásito con diferente grado de virulencia, las cuales se pueden identificar a través del estudio de los segmentos polimórficos de los genes de la quitinasa y la proteína rica en serina. De igual forma, estos marcadores nos permitirán realizar estudios sobre la distribución y transmisión de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en la población, lo que nos permitirá entender mejor a la amibiasis.

MATERIAL Y METODOS

Protocolo. Este trabajo forma parte de un estudio longitudinal tendiente a evaluar la prevalencia y morbilidad de *E. histolytica* y *E. dispar* en las comunidades de Casahuatlán y Cuahuixtla, que se encuentran en el estado de Morelos, aproximadamente a 150 Km. al sur de la Ciudad de México. Los factores que influyeron en la selección de estas comunidades fueron: la tasa de amibiasis intestinal del Estado (en el año 2000, la tasa de amibiasis intestinal a nivel nacional fue de 1353.43 casos por cada 100 000 habitantes y en el estado de Morelos fue de 2210.81 por cada 100 000 habitantes) [62], el tamaño de las comunidades y la proximidad con la ciudad de México. Además, se estableció una colaboración con los ‘Hospitales 1° de Octubre’ del ISSSTE y el ‘Hospital General’ de la SS, con el fin de captar a los pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

Tanto los individuos de las comunidades estudiadas como los pacientes que ingresaron a los hospitales con un diagnóstico de absceso hepático amibiano, fueron entrevistados por miembros del grupo de investigación. En todos los casos se les explicó el propósito de nuestro estudio y las personas que decidieron participar firmaron una carta de consentimiento informado. El protocolo de investigación fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como por los Comités de Ética de los hospitales participantes.

Muestreo. A todas las personas que participaron en el estudio se les pidieron 3 muestras de heces de días consecutivos que se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento. La presencia de parásitos se determinó por análisis microscópico directo de la muestra de heces, teñida con una solución de yodo al 4%. Posteriormente, los quistes se concentraron por flotación mediante centrifugación en una solución acuosa de $ZnSO_4$ con una $\delta=1.19$ (aproximadamente al 35%) [6]. Brevemente, las muestras de heces se homogenizaron en solución salina (SS) (NaCl 0.15M) y se filtraron a través de gasa para eliminar detritos. El filtrado se centrifugó a 500g durante 1 minuto a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en la

solución de ZnSO₄ y se centrifugó nuevamente a 500g por 1 minuto. El disco de flotación que se formó en la parte superior de la suspensión después de la centrifugación, se separó con una pipeta Pasteur. El material obtenido se lavó mediante centrifugación con solución salina 0.15 M, recuperando siempre el sedimento, hasta que el sobrenadante fue claro. Una muestra de este último sedimento se tiñó con yodo y se analizó microscópicamente para identificar los quistes presentes. La otra parte del sedimento se guardó en refrigeración hasta su utilización en la extracción de ADN.

De igual forma, en los casos en que fue posible, las muestras de heces fueron sembradas en medio de Robinson [58] y los trofozoítos que crecieron se cosecharon por centrifugación a 300g para su posterior caracterización por ELISA y PCR.

En los casos en que fue necesario, de acuerdo al criterio del grupo de médicos encargados de los pacientes con absceso hepático, el absceso fue drenado por personal de cirugía del hospital. Una porción del material colectado se sembró en diferentes medios de cultivo (Robinson, Lee, PY, LYI-S2) con el propósito de aislar al parásito; el resto del drenado se distribuyó en alícuotas y se congeló hasta su utilización.

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN, tanto los quistes como los trofozoítos fueron transferidos a tubos Eppendorf de 2 ml, lavados con SS y resuspendidos en 300 µl de solución de lisis (EDTA 100 mM pH 8, SDS 0.25%) [16]. En el caso de los quistes, los tubos fueron sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación (etanol-hielo seco/baño María a 37°C). En el caso de los drenados hepáticos, 150 µl del drenado se mezclaron con 150 µl de solución de lisis 2X. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron 1 hr. a 55°C. Después de la digestión con proteinasa K, el lisado se llevó a una concentración de NaCl 0.7 M y 1% de CTAB (Sigma Chemical, Co St Louis, MO, USA). La mezcla se incubó 30 min. a 65°C y posteriormente se hicieron extracciones con cloroformo, fenol-cloroformo y cloroformo. El ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en 50 µl de H₂O. Finalmente, el ADN se pasó por una mini columna con Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los drenados de hígado también se procesaron con el equipo de extracción de ADN QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia CA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el ADN obtenido y una serie de iniciadores seleccionados, se realizaron amplificaciones mediante PCR en mezclas de reacción de 20 µl, con el fin de identificar y caracterizar a la especie de amiba presente. Los iniciadores que se utilizaron fueron: RD, Psp; NPsp, SRPEh, nSRPEh, SRPEd, CHI, CHIEh y CHIEd (Tabla 1).

Tabla 1

Iniciadores utilizados

Iniciador	Secuencia
RD5	GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA
RD3	GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC
Psp5	GGCCAATTCATTCAATGAATTGAG
Psp3	CTCAGATCTAGAAACAATGCTTCTC
NPsp5	GGCCAATTTATGTAAGTAAATTGAG
NPsp3	CTTGGATTTAGAAACAATGTTTCTTC
SRP Eh5	CCTGAAAAGCTTGAAGAAGCTG
SRP Eh3	AACAATGAATGGACTTGATGCA
nSRPEh5	TGAAGATAATGAAGATGATGAAGATG
nSRPEh3	TATTATTATCGTTATCTGAACTACTTCCTG
SRPEd5	GTAGTTCATCAAACACAGGTGA
SRPEd3	CAATAGCCATAATGAAAGCAA
CHI5	GAAS [*] AACAGAAGGAACACCAGG
CHI3	GGGAY ⁺ ACTAACTTCTGGCTCAG
CHIEh5	GGAACACCAGGTAAATGTATA
CHIEhEd3	TCTGTATTGTGCCCAATT
CHIEd5	GGAACACCAGGTAAATGCCTT
CHIEhEd3	TCTGTATTGTGCCCAATT

* S = C + G

+ Y = C + T

Los iniciadores RD son inespecíficos y amplifican un segmento de 1950 pb tanto en *E. histolytica* (cepa HM1:IMSS) como en *E. dispar* (cepa SAW760 RR) que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal [16, 22]. Los iniciadores Psp son específicos para *E. histolytica*, mientras que los iniciadores NPsp son específicos para *E. dispar* [16, 22]. Ambos iniciadores generan un segmento de 876 pb que es parte del amplicón RD. Con estos 3 pares de iniciadores, las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, MgCl₂ 2 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.025 U/μl de polimerasa (Ampli Taq Gold Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA) y 1 μM de cada iniciador. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1.5 min. a 55°C y 2 min. a 72°C. Para la amplificación con los iniciadores RD se utilizaron 2 μl de ADN de la muestra; mientras que con los iniciadores Psp y NPsp se utilizó 1 μl del amplificado RD diluido 1:10.

Los iniciadores SPREh y nSRPEh amplifican un segmento del gen de las proteínas ricas en serina de *E. histolytica* y generan fragmentos de 553 y 452 pb respectivamente en la cepa HM1:IMSS [8]. En ambos casos, las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, 0.001% de gelatina, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.025 U/μl de polimerasa (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA) y 1 μM de cada iniciador. La amplificación se realizó con 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1.5 min. a 67°C y 2 min. a 72°C. Para la amplificación con los iniciadores SRPEh se utilizaron 2 μl de ADN de la muestra y para la amplificación con los iniciadores nSRPEh se utilizó 1 μl del amplificado SRPEh diluido 1:10.

Los iniciadores SRPEd son específicos para *E. dispar* y amplifican un fragmento de 567 pb del gen de las proteínas ricas en serina en la cepa SAW760 RR. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores SRPEh, solo que en este caso, la temperatura de alineamiento fue de 64°C. Cuando los resultados no fueron claros, se efectuó una reamplificación con los mismos iniciadores y 1 μl del amplificado.

Los iniciadores CHI amplifican un segmento del gen de la quitinasa de 319 pb en *E. histolytica* (HM1:IMSS) y de 528 pb en *E. dispar* (SAW760 RR). En este caso las condiciones de reacción fueron: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.001%, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2 mM de cada nucleótidos, 1 μM de cada iniciador, BSA 0.15 mg/ml,

polimerasa 0.025 U/ μ l (AmpliTaq Gold Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA), con 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1.5 min. a 67°C y 2 min. a 72°C.

Los iniciadores CHIEh y CHIEd amplifican segmentos del gen de la quitinasa de 351 y 561 pb en *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente [33]. Con estos iniciadores, las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas con los iniciadores CHI, salvo la temperatura de alineamiento que fue de 55°C.

En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 10 min. a 94°C y al finalizar los 35 ciclos se dio otro ciclo de 8 min. a 72°C. Los productos de PCR se identificaron y analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5-2.0 % en presencia de bromuro de etidio para su visualización y se fotografiaron para tener su registro.

Polimorfismo de los fragmentos de restricción. Los amplificados del gen de las proteínas ricas en serina de *E. dispar*, se concentraron mediante precipitación con etanol [7]. Brevemente, a un volumen del amplificado se le agregó 1/10 del volumen de una solución de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se agitó; se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol (100%) frío, se agitó nuevamente y se dejó en reposo 15 min. en hielo; la mezcla se centrifugó a alta velocidad (16 000g) durante 5 min. después de lo cual se eliminó el sobrenadante. El precipitado se dejó en el tubo destapado a temperatura ambiente para que se evaporara el etanol. Finalmente el precipitado se resuspendió en H₂O (generalmente $\frac{1}{4}$ parte del volumen inicial). Los amplificados ya concentrados se trataron con la enzima de restricción *Alu I* (Promega Corporation, Madison WI) y se dejaron 3 hrs. a 37°C, de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes (1U/ μ g de ADN). Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2-2.5% y se fotografiaron para guardar su registro. Los patrones obtenidos se analizaron y se clasificaron.

Secuenciación. Los amplificados obtenidos del gen de la quitinasa, se separaron en geles de agarosa al 1.5-2%. Las bandas observadas se cortaron y purificaron con equipos comerciales (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen Inc., Valencia CA). Los amplificados purificados se reamplificaron (en volúmenes de reacción de 20 μ l), repurificaron y

cuantificaron antes de la secuenciación. Los amplificados se marcaron por PCR en mezclas de reacción de 20 μ l con el sistema ABI Prism BigDye Terminador Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA.) siguiendo las instrucciones del productor en un equipo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los amplificados marcados se pasaron por columna (Centri-Sep, Princeton Separations, Inc.) para eliminar el colorante no incorporado y posteriormente se concentraron hasta 10 μ l en un concentrador por vacío (Jouan RCT60, Francia). Finalmente, las muestras fueron secuenciadas por el método de secuenciación fluorescente por capilar en un equipo ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA) por los Drs. Paul Gaytán y Jorge Yañez del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron, alinearon y compararon con secuencias ya reportadas en la literatura [24].

RESULTADOS

Como anteriormente se mencionó, este trabajo forma parte de un estudio longitudinal que se realizó en las comunidades de Casahuatlán y Cuahuixtla, en el estado de Morelos. La caracterización de las cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* que crecieron en medio de cultivo ya está concluida. Sin embargo, la caracterización de *E. histolytica* y *E. dispar* directamente de las muestras de heces solo se ha completado en 1 de las 4 etapas en las que estuvo dividido el estudio. En este trabajo se muestran los datos obtenidos de estas comunidades, algunos de los cuales ya fueron publicados (anexos I y II).

Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar*. Los resultados del análisis microscópico y de PCR de las muestras de heces de la comunidad de Cuahuixtla, se muestran en la Tabla 2 y los de la comunidad de Casahuatlán se muestran en la Tabla 3.

TABLA 2
Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en la comunidad de Cuahuixtla determinado mediante el Análisis Coproparasitológico y de PCR en muestras de heces

		P C R					
		Eh	Ed	Eh y Ed	OP	Neg	TOTAL
C P S	Eh/Ed	2	18	6	7	4	37
	OP	14	2	0	55	17	88
	Neg	17	1	1	73	73	165
	TOTAL	33	21	7	135	94	290

El valor representa el número de casos en los que se identificó: solo *E. histolytica* (Eh), solo *E. dispar* (Ed), ambos parásitos (Eh y Ed), parásitos distintos a Eh y Ed (OP) ó ningún parásito (Neg), mediante PCR y Análisis Coproparasitológico (CPS). El PCR se realizó con los iniciadores Psp, NPsp, SRPEh y SRPEd. El análisis microscópico no permite distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* y por lo tanto se reportan como complejo Eh/Ed.

Sensibilidad* = $(26/37) \times 100 = 70.4 \%$.

Especificidad* = $(218/253) \times 100 = 86.2 \%$.

*Tomando como referencia el Análisis Coproparasitológico (CPS).

TABLA 3
Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en la comunidad de Casahuatlán determinado mediante el Análisis Coproparasitológico y de PCR en muestras de heces

		P			C	R	TOTAL
		Eh	Ed	Eh y Ed	OP	Neg	
C	Eh/Ed	14	26	15	12	3	70
P	OP	50	0	5	96	51	202
S	Neg	72	0	2	77	61	212
	TOTAL	136	26	22	185	115	484

El valor representa el número de casos en los que se identificó: solo *E. histolytica* (Eh), solo *E. dispar* (Ed), ambos parásitos (Eh y Ed), parásitos distintos a Eh y Ed (OP) ó ningún parásito (Neg), mediante PCR y Análisis Coproparasitológico (CPS). El PCR se realizó con los iniciadores Psp, NPsp, SRPEh y SRPEd. El análisis microscópico no permite distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* y por lo tanto se reportan como complejo Eh/Ed.

Sensibilidad* = $(55/70) \times 100 = 78.6 \%$.

Especificidad* = $(285/414) \times 100 = 68.8 \%$.

*Tomando como referencia el Análisis Coproparasitológico (CPS).

Por microscopía, la prevalencia de *E. histolytica*/*E. dispar* fue del 12.8% en Cuahuixtla y del 14.5% en Casahuatlán, mientras que por PCR fue del 21% y 38% respectivamente. Además, el PCR nos permitió determinar que la prevalencia de *E. histolytica* fue del 13.8% en Cuahuixtla y del 32% en Casahuatlán, mientras que la de *E. dispar* fue de 9.7% en Cuahuixtla y 9.9% en Casahuatlán. Observamos también que la frecuencia de infecciones mixtas (*E. histolytica* + *E. dispar*) fue del 2.4% en Cuahuixtla y del 4.5% en Casahuatlán. Vale la pena resaltar que en ambas comunidades la frecuencia de infección por *E. histolytica* fue mayor que la de *E. dispar*. De igual forma, se puede ver que los resultados obtenidos por PCR no muestran una buena correlación con los obtenidos por microscopía.

Cultivo de Robinson. Algunas de las muestras de heces que se colectaron en las comunidades fueron sembradas en medio de Robinson. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. De las 376 muestras sembradas, solo fue posible obtener cultivos estables en 89 de ellas (23.7%). El análisis por PCR (y en algunos casos también por ELISA, datos no mostrados) de los 89 aislados obtenidos, mostró que en 85 de ellos (95.5 %) el parásito aislado fue *E. dispar*, en ningún caso se identificó a *E. histolytica* y las 4 muestras restantes correspondieron a parásitos distintos de *E. histolytica* y de *E. dispar* (Tabla 4, Figura 1). Además, de las 85 muestras positivas para *E. dispar*, 63 (74.1 %) provenían de Casahuatlán y 22 (25.9%) de Cuahuixtla.

TABLA 4
Resultados del Cultivo de Robinson.

Muestras sembradas	Cultivos estables	Especie identificada por PCR	
376	89	<i>E. histolytica</i>	0 (0%)
		<i>E. dispar</i>	85 (95.5%)
		OP	4 (4.5%)

OP: Otros parásitos distintos a *E. histolytica* y a *E. dispar*.

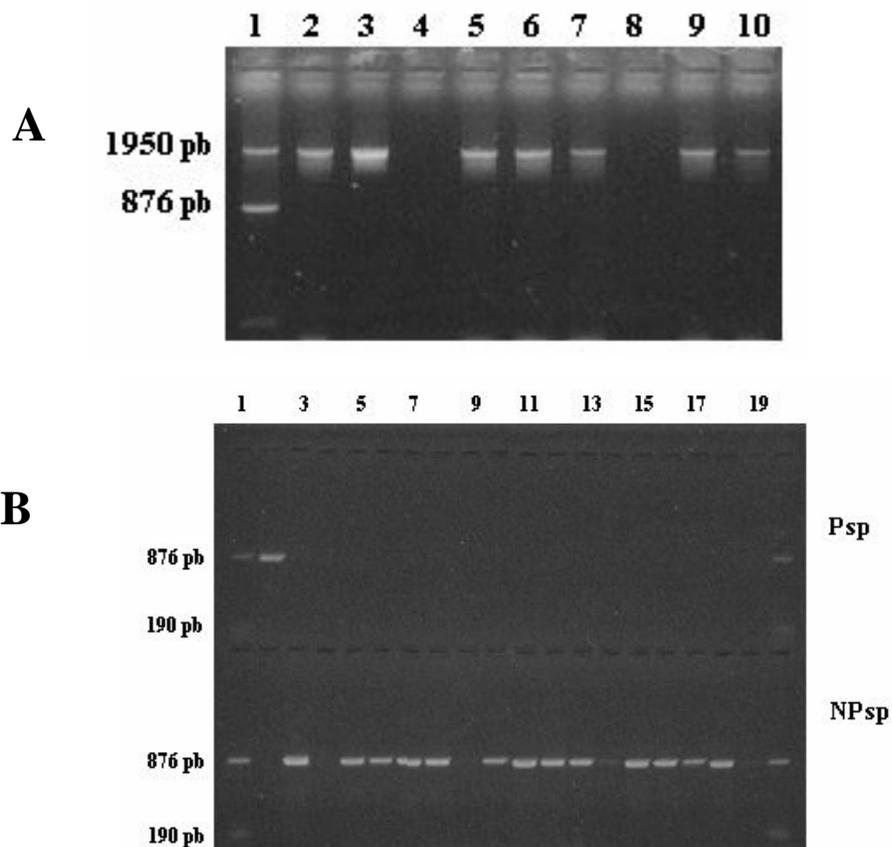


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores RD (A), Psp (B superior) y NPsp (B inferior). A: carril 1, marcador de 1950 y 876 pb; carril 2-4, controles *E. histolytica* HM1:IMSS, *E. dispar* SAW 760 y H₂O; carril 5-10, muestras de aislados de cultivo de Robinson. B: carriles 1 y 20, marcadores de 876 y 190 pb; carriles 2-4, controles de *E. histolytica* HM1:IMSS, *E. dispar* SAW760 y H₂O; carril 5-19, muestras de aislados de cultivo de Robinson.

Posteriormente, se procedió con el análisis del polimorfismo de los genes que codifican para las quitinasas y las proteínas ricas en serina, mediante la amplificación de los segmentos repetidos en tandem que los constituyen. El análisis del gen de las quitinasas

constituyó la base del artículo publicado en *Molecular and Biochemical Parasitology* (Anexo II). La amplificación con los iniciadores CHI, generó fragmentos de diferente tamaño (Figura 2), lo que nos indicaba que algunos de los segmentos repetidos en tandem eran diferentes en los distintos aislados, por lo cual se procedió a su secuenciación (ver detalles en Anexo II).

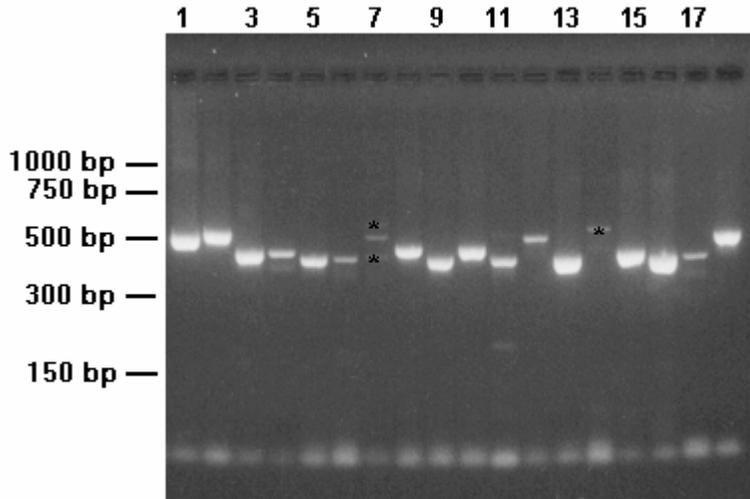


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores CHI5/3. Carriles 1 y 18: controles de *E. dispar* SAW760; carriles 2-17: muestras de aislados de *E. dispar* de Cultivo de Robinson. Las bandas con asterisco son productos de PCR irrelevantes, determinado por secuenciación.

De los 85 aislados de *E. dispar*, solo se pudieron amplificar y secuenciar 59 con los iniciadores CHI; además, estas 59 secuencias pudieron ser ordenadas en 13 grupos o patrones distintos. La secuencia de nucleótidos de estos 13 grupos y su alineamiento se muestra en el Anexo III. Para facilitar su análisis las secuencias de nucleótidos fueron traducidas. Tomando en cuenta la nomenclatura utilizada por Ghosh y col. [33], a los heptapéptidos del segmento polimórfico de las quitinasas se les asignó un número, el cual dependió de la secuencia de aminoácidos que los constituían. Los distintos patrones de aminoácidos identificados en las comunidades en este estudio se muestran en la Tabla 5. Si se considera el origen del aislado y el patrón obtenido se tiene que 15 de las 59 muestras procedían de Cuahuixtla y pudieron ser ordenadas en 5 patrones distintos; las otras 44 muestras procedían de Casahuatlán y fueron ordenadas en 12 patrones distintos. De los 13 patrones distintos identificados, solo 4 fueron observados tanto en Casahuatlán como en Cuahuixtla (Tabla 5).

Tabla 5

Patrones de secuencias de aminoácidos en el segmento polimórfico del gen CHI, en aislados de *E. dispar* provenientes de las comunidades de Casahuatlan y Cuahuixtla

Código*	Patrón	Núm. de aislados en:	
		Cuahuixtla	Casahuatlán
GRX8a	1-2-3-4-4-7-4-3 ^a	1	-
GRX10a	1-2-3-4-5-7-7-3-7-3 ^a		1
GRX13a	1-2-3-4-5-7-6-7-7-3-7-3 ^a	-	2
GRX14a	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-3-7-3^b	3	7
GRX14b	1-2-3-4-5-7-6-7-7-7-3-7-3^b	7	9
GRX14c	1-2-3-4-4-7-6-7-7-7-3-7-3 ^a	-	1
GRX15a	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3^b	1	7
GRX15b	1-2-4-4-4-5-4-6-7-7-7-3-7-3 ^a	-	3
GRX15c	1-2-3-4-5-7-6-7-7-7-7-3-7-3 ^a	-	1
GRX16a	1-2-3-2-4-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3 ^b	-	10
GRX18a	1-2-3-2-4-4-4-4-4-5-4-6-7-7-3-7-3^b	3	1
GRX18b	1-2-3-2-4-4-4-5-4-6-7-7-7-7-3-7-3 ^a	-	1
GRX19a	1-2-3-2-4-4-4-4-4-4-4-5-4-6-7-3-7-3 ^a	-	1
Total de aislados		15	44
Total de patrones diferentes		5	12

Los números en los patrones corresponden a las secuencias de aminoácidos: 1, EKLPDSS; 2,DTKPDSS; 3, ESKHESS; 4, EIHPDSS; 5, DCKLDSS; 6, DCKPDSS; 7, EVKPDSS.

* Número de acceso al Gen Bank: de AY820940 a AY820952.

^a Nuevo patrón obtenido en este estudio.

^b Patrones reportados por Ghosh y col.[33].

Un procedimiento similar se utilizó para analizar el polimorfismo del segmento repetido del gen que codifica para las proteínas ricas en serina de *E. dispar*, aunque en este caso, los amplificados no se secuenciaron, sino que se cortaron con la enzima de restricción *Alu I* y se analizaron los patrones generados. La Figura 3 muestra la electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores SRPEd y el ADN de algunos de los aislados obtenidos en el cultivo de Robinson; también se muestran algunos de los patrones de restricción que se generaron cuando el amplificado fue tratado con la enzima

Alu I. Puede verse que algunos de los amplificados obtenidos fueron de diferente tamaño y que los patrones de restricción obtenidos también fueron distintos en algunos casos.

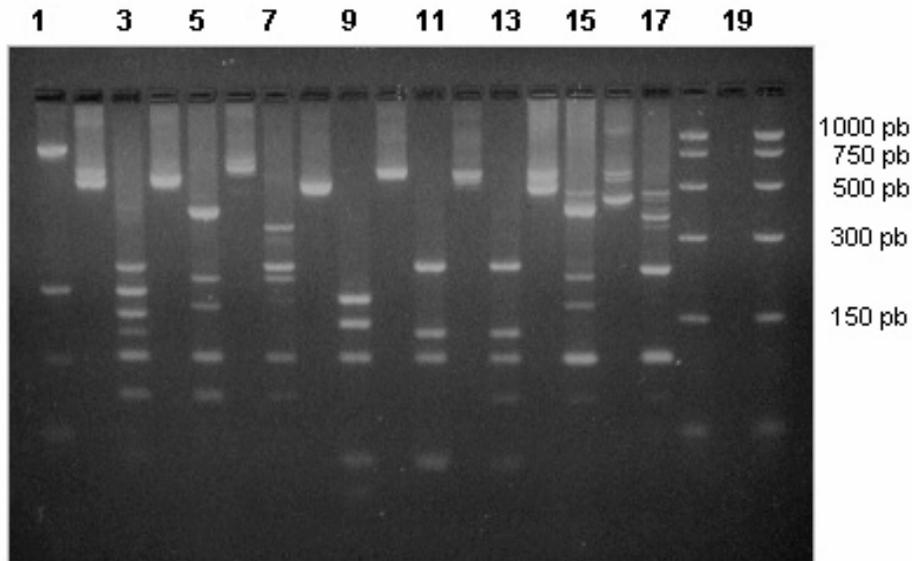


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con el ADN de los aislados de cultivo de Robinson y los iniciadores SRPEd (carriles 2,4,6,8,10,12,14 y 16) y el producto de digestión de este amplificado al ser tratado con la enzima *Alu I* (carriles 3,5,7,9,11,13,15 y 17). Carril 1, marcador de 876 pb, 190 pb y 100 pb. Carril 18 y 20, marcador de PCR (1000, 750, 500, 300 150 y 50 pb).

Mediante este procedimiento fue posible amplificar y obtener el patrón de restricción correspondiente en 67 de los aislados identificados como *E. dispar*; 47 de estos aislados procedían de Casahuatlán y 20 de Cuahuixtla. Con estos 67 aislados fue posible identificar 34 patrones de restricción distintos; en Casahuatlán se identificaron 24 patrones de restricción distintos entre si, mientras que en Cuahuixtla se identificaron solo 14 patrones distintos. Vale la pena aclarar que 4 de los 34 patrones identificados se observaron en ambas comunidades, mientras que los otros 30 se observaron solo en una u otra de las comunidades (Tabla 6). Los 4 patrones compartidos comprenden a 10 personas de Casahuatlán y 8 de Cuahuixtla.

Solo en 50 aislados (37 de Casahuatlán y 13 de Cuahuixtla) fue posible obtener tanto los patrones de las quitinasas como los de las proteínas ricas en serina al mismo tiempo, lo cual generó 33 genotipos distintos y solo 2 de ellos fueron compartidos por las 2 comunidades, genotipos 14a-D y 14b-Z (Tabla 7); en Cuahuixtla se identificaron 10 genotipos distintos mientras que en Casahuatlan se identificaron 25.

TABLA 6
Patrones de restricción identificados en las comunidades de Cuahuixtla y Casahutlan al amplificar el segmento polimórfico del gen SRP y su posterior digestión con *Alu* I

Patrón de SRP	Número de aislados en:	
	Cuahuixtla	Casahuatlán
B	-	2
C	-	2
D	2	6
D1	-	1
D2	-	1
E	-	1
F	-	2
G	-	1
H	-	1
I	-	1
K	-	5
K1	1	-
K1b	1	-
K2	1	-
L	-	1
M	-	1
N	-	1
Ñ	-	4
P	-	5
P1	-	1
Q	-	1
S	1	-
S1	1	1
U	-	1
V	-	1
W	2	2
W1	-	4
X1	1	-
Z	3	1
Z1	2	-
Z2	2	-
Z3	1	-
Z4	1	-
Z5	1	-
Total de muestras	20	47
Total de patrones	14	24

TABLA 7
Frecuencia de genotipos identificados en las 2 comunidades teniendo en cuenta los patrones de quitinasas y proteínas ricas en serina

<i>GENOTIPO</i>	<i>Frecuencia en:</i>	
	<i>Cuahuixtla</i>	<i>Casahuatlán</i>
8a-K1b	1	-
10a-D	-	1
13a-P1	-	1
14a-D	2	2
14a-D1	-	1
14a-K	-	1
14a-N	-	1
14a-V	-	1
14a-Z3	1	-
14b-B	-	1
14b-D	-	1
14b-D2	-	1
14b-G	-	1
14b-W	1	-
14b-W1	-	2
14b-X1	1	-
14b-Z	2	1
14b-Z1	2	-
14c-B	-	1
15a-D	-	1
15a-P	-	5
15a-Z5	1	-
15b-Ñ	-	3
15c-M	-	1
16a-F	-	2
16a-I	-	1
16a-K	-	4
16a-W1	-	1
18a-S1	-	1
18a-W	1	-
18a-Z2	1	-
18b-L	-	1
19a-E	-	1
Total de muestras	13	37
Total de genotipos	10	25

Las Tablas 8 muestran algunos de estos mismos resultados, pero agrupados con base al genotipo, lo que permite resaltar algunos hechos importantes. Se puede observar que el

mismo genotipo puede ser portado por diferentes personas de la misma comunidad, durante la misma etapa ó en diferentes etapas del estudio. Además, de las personas identificadas con las claves 2026.11, 2057.02 y 717.11 se pudo aislar al parásito con el mismo genotipo en 2 etapas distintas consecutivas o espaciadas, es decir, estas muestras fueron tomadas con un intervalo de tiempo, de por lo menos 2 a 4 meses (Tabla 8).

TABLA 8
Agrupamiento de aislados de cultivo de Robinson con base en el genotipo

PACIENTE*	COMUNIDAD	ETAPA	GENOTIPO
2059.02	Cuahuixtla	4.1	14a-D
2059.02	Cuahuixtla	4.2	14a-D
717.01	Casahuatlán	2	14a-D
717.01	Casahuatlán	4	14a-D
657.02	Casahuatlán	3	14b-W1
739.02	Casahuatlán	4	14b-W1
2057.02	Cuahuixtla	3	14b-Z
2057.02	Cuahuixtla	4	14b-Z
801.08	Casahuatlán	4	14b-Z
2026.11	Cuahuixtla	3	14b-Z1
2026.11	Cuahuixtla	4	14b-Z1
530.01	Casahuatlán	4	15a-P
543.09	Casahuatlán	3	15a-P
546.02	Casahuatlán	4	15a-P
613.08	Casahuatlán	4	15a-P
859.09	Casahuatlán	4	15a-P
519.09	Casahuatlán	4	15b-Ñ
611.01	Casahuatlán	4	15b-Ñ
702.04	Casahuatlán	4	15b-Ñ
739.07	Casahuatlán	3	16a-F
761.09	Casahuatlán	4	16a-F
680.09	Casahuatlán	3.1	16a-K
680.09	Casahuatlán	3.2	16a-K
680.09	Casahuatlán	4	16a-K
802.07	Casahuatlán	4	16a-K

* Los enteros hacen referencia a la familia y los decimales al miembro de la familia.

A pesar de que los datos agrupados por familias no son muy abundantes se pueden destacar algunos hechos (Tabla 9). Los 2 miembros de la familia 546 portaron al parásito

con el mismo genotipo durante la misma etapa; en cambio, otras familias albergaron a parásitos con diferente genotipo en diferentes etapas (familias 543, 739, 680) o durante la misma etapa (familias 607 y 680). Sin embargo, en los individuos 680.09 y 2059.02 fue posible identificar a parásitos con el mismo genotipo dentro de la misma etapa. Cabe resaltar que en el individuo 680.09 se identificó al parásito con diferente genotipo en muestras pertenecientes a la misma etapa, lo que involucró un periodo de tiempo entre las 2 tomas de muestras de entre 1 a 7 días. También se encontró que los miembros de la familia 607 estuvieron infectados por parásitos con diferente genotipo durante la misma etapa.

TABLA 9
Agrupamiento por familia de aislados de cultivo de Robinson.

CLAVE*	COMUNIDAD	ETAPA	GENOTIPO
543.09	Casahuatlán	4	14b-G
543.09	Casahuatlán	3	15a-P
546.01	Casahuatlán	4	15a-P
546.02	Casahuatlán	4	15a-P
607.02	Casahuatlán	4	14a-D1
607.07	Casahuatlán	2	14a-K
607.08	Casahuatlán	4	18b-L
607.10	Casahuatlán	4.1	14b-D2
607.10	Casahuatlán	4.2	16a-I
680.08	Casahuatlán	4	16a-W1
680.09	Casahuatlán	3.1	16a-K
680.09	Casahuatlán	3.2	16a-K
680.09	Casahuatlán	4	16a-K
717.01	Casahuatlán	2	14a-D
717.01	Casahuatlán	4	14a-D
739.02	Casahuatlán	4	14b-W1
739.07	Casahuatlán	3	16a-F
2026.11	Cuahuixtla	3	14b-Z1
2026.11	Cuahuixtla	4	14b-Z1
2057.02	Cuahuixtla	3	14b-Z
2057.02	Cuahuixtla	4	14b-Z
2059.02	Cuahuixtla	4.1	14a-D
2059.02	Cuahuixtla	4.2	14a-D

* Los enteros hacen referencia a la familia y los decimales al miembro de la familia.

Absceso Hepático Amibiano. Como se mencionó anteriormente, la Dra. Ximénez estableció una colaboración con ciertos departamentos del Hospital General con el fin de identificar, aislar y/o caracterizar a la(s) cepa(s) del parásito responsable(s) de los abscesos hepáticos amibianos. De finales de 1999 a mediados del 2006, llegaron a los pabellones de Medicina Interna, Infectología, Cirugía y Gastroenterología del Hospital General, 185 pacientes con diagnóstico de absceso hepático, de los cuales 69 fueron amibianos, 49 piógenos, 22 mixtos y 45 con otros padecimientos. En la actualidad, para poder aislar y caracterizar al parásito invasor es necesario disponer o contar con una porción del tejido u órgano afectado. Sin embargo, no en todos los casos de absceso hepático amibiano o de otro tipo está indicada la punción y drenado del absceso con fines terapéuticos, lo cual limita el material biológico partir del cual se puede aislar y/o caracterizar al parásito. Por esta razón, de los 185 casos de absceso hepático antes mencionados la punción hepática solo fue indicada en 43, de los cuales 17 fueron amibianos, 12 piógenos, 12 mixtos y 2 de otro tipo.

Los drenados provenientes de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano o mixto fueron sembrados en los diferentes medios de cultivo para parásitos antes mencionados; sin embargo, en ningún caso obtuvimos crecimiento amibiano. Por otro lado, los drenados fueron procesados de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos con el fin de obtener ADN y utilizarlo en la amplificación de segmentos de ADN de nuestro interés.

Las Figuras 4 a 6 y 8 muestran algunos resultados obtenidos con los distintos iniciadores y la Tabla 10 resume los resultados. Podemos ver que solamente 4 de los 30 ADNs obtenidos de los diferentes drenados amplificaron con todos los iniciadores (Tabla 10), que 9 muestras amplificaron con 3 iniciadores, 7 muestras con 2 iniciadores, otras 7 con 1 iniciador y que hubo 3 muestras que no amplificaron con ninguno de los iniciadores utilizados. Este hecho se puede ver claramente en los diferentes geles (Figuras 4 a 6 y 8) ya que hay carriles en donde no se observó banda alguna. También podemos ver en la Tabla 10 que los iniciadores CHI mostraron ser los mas eficientes ya que amplificaron a 17 de las 22 muestras probadas (80%), mientras que los iniciadores RD fueron los menos eficientes ya que amplificaron 15 de 30 muestras analizadas, seguidos de los Psp que amplificaron 16 de las 30 muestras probadas (53.3%); los iniciadores nSRPEh tuvieron

TABLA 10
Resultado de las amplificaciones realizadas con el ADN procedente de drenados hepáticos o pleurales de pacientes con abscesos hepáticos.

Paciente	Material Biológico	Dx	Iniciadores			
			RD	Psp	nSRPEh	CHI
A 10	dH	AHA	-	-	+	+
A 17	dH	AHM	+	+	+	+
A 23	dH	AHA	+	+	+	+
A 27	dH	AHA	+	-	NR	NR
A 29	dH	AHM	+	-	-	+
A 45	dH	AHM	-	+	+	-
A 45	dP	AHM	+	+	+	+
A 49	dH	AHM	+	+	+	+
A 51	dH	AHM	+	-	-	+
A 52	dH	AHA	+	+	+	-
A 53	dH	AHM	-	-	-	+
A 55	dP	AHA	+	+	-	+
A 56	dH	AHA	-	-	-	+
A 58	dP	AHA	-	-	-	+
A 60	dH	AHA	-	+	+	+
A 67	dH	AHM	+	+	+	-
A 76	dH	AHA	-	-	-	-
A 76	dP	AHA	+	-	+	-
A 77	Vom	AHA	-	+	+	NR
A 87	dH	AHM	-	-	-	+
A 92	dH	AHA	-	+	+	+
A 95	dH	AHM	-	+	+	+
A 97	dH	AHA	-	+	+	+
A 104	dH	AHA	+	+	+	NR
A 109	dH	AHM	-	-	-	NR
A 115	Vom	AHA	+	-	-	NR
A 116	dH	AHA	+	-	+	+
A 117	dH	AHA	+	+	NR	NR
A 118	dH	AHA	-	+	NR	NR
N 76	dH	AHM	-	-	-	NR

Abreviaciones: dH, drenado hepático; dP, drenado pleural; vom, vómica; Dx, diagnóstico; AHA, absceso hepático amibiano; AHM, absceso hepático mixto; NR, no realizado.

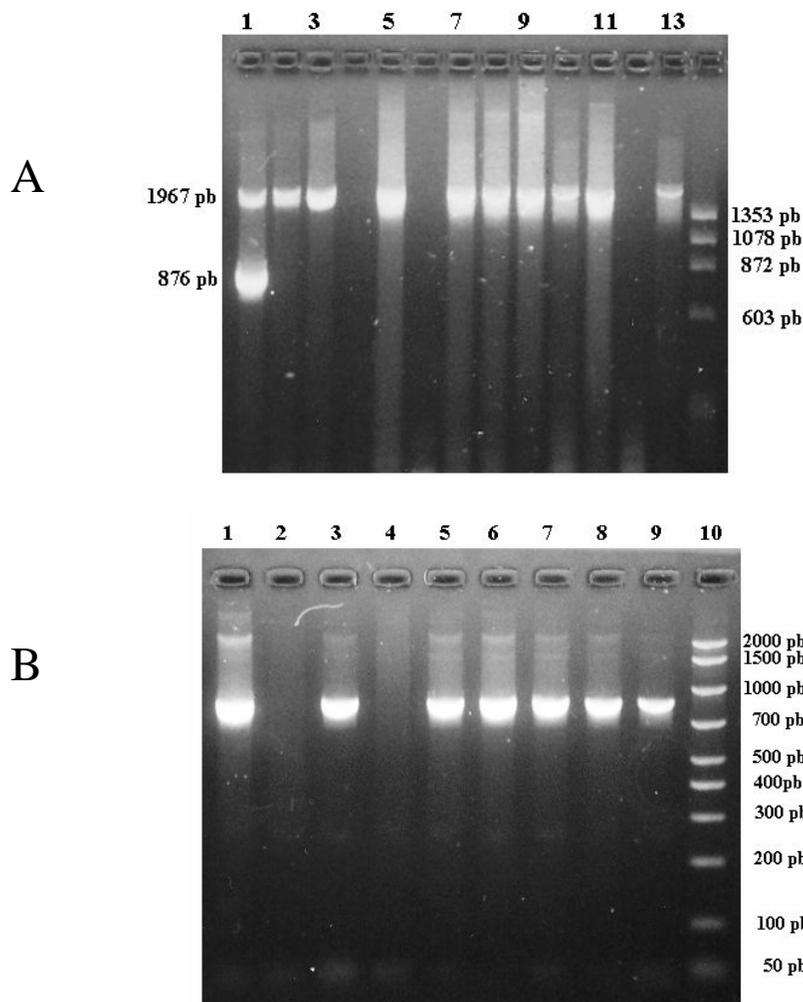


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 y 2.0% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con el ADN de drenados hepáticos y los iniciadores RD (A) y Psp (B). **A:** Carril 1, marcador de 1967 y 876 pb; carriles 2-4, controles con ADN de *E. histolytica* HM1:IMSS, *E. dispar* SAW 760 y H₂O; carriles 5-13, ADN de diferentes drenados hepáticos; carril 14, marcador de pesos (ϕ X174 RF /Hae III). **B:** Carriles 1 y 3, controles con ADN de *E. histolytica* HM1:IMSS, carril 2, control con ADN de *E. dispar* SAW 760; carril 4, control de H₂O; carriles 5-9, ADN de diferentes drenados hepáticos; carril 10, marcador de peso (AmpliSize, Bio-Rad).

una eficiencia intermedia amplificando al 59.3 % de las muestras.

Los iniciadores RD y Psp amplificaron segmentos bien definidos de 1967 y 876 pb respectivamente (Figura 4). En cambio, los iniciadores CHI (Figuras 5 y 6) y nSRPEh (Figura 8) amplificaron segmentos polimórficos, lo cual se evidencia por el hecho de que algunos amplificados que se generaron con estos iniciadores presentaron diferente tamaño. En algunos casos la diferencia de tamaño de los amplificados obtenidos con los iniciadores CHI no fue muy grande, lo cual se observa claramente en la Figura 5. En otros casos como se muestra en la Figura 6, los amplificados mostraron el mismo tamaño, pero este fue menor que el de la cepa control (*E. histolytica* HM1:IMSS).

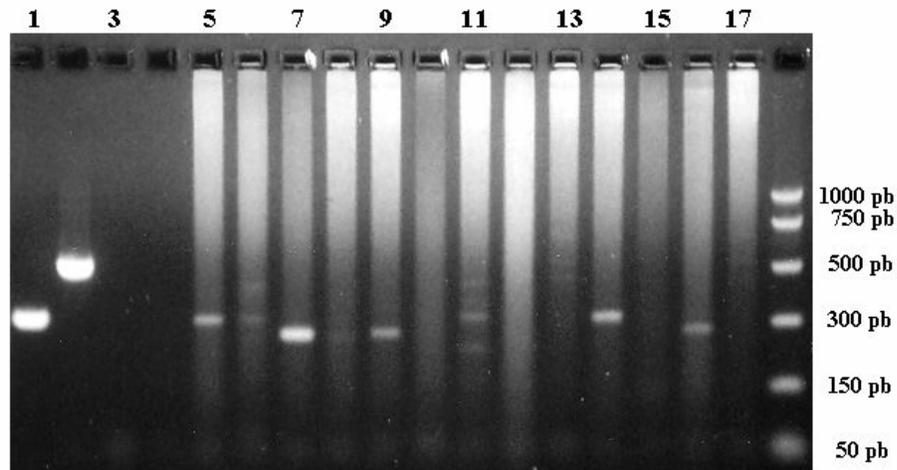


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores CHI y el ADN de drenados hepáticos. Carril 1, control con ADN de *E histolytica* HM1:IMSS; carril 2, control con ADN de *E dispar* SAW 760; carril 3, control de H₂O; carriles 4-17, ADN de diferentes drenados hepáticos; carril 18, marcador de pesos (PCR markers, Promega).

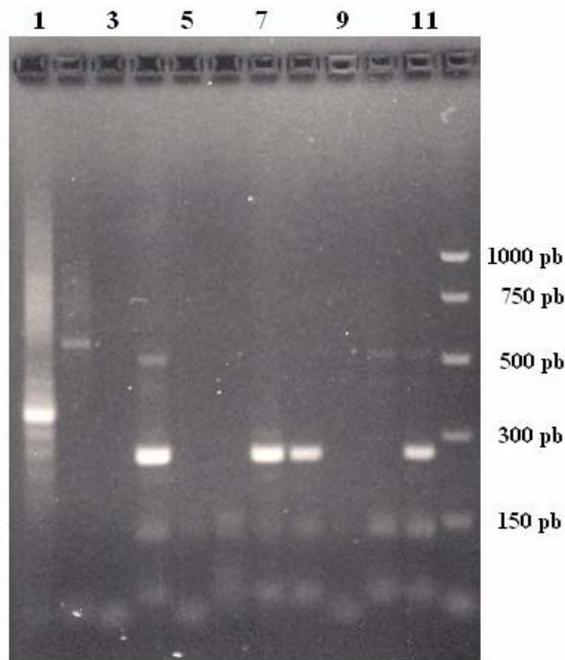


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores CHIEh y el ADN de drenados hepáticos (dH) o drenados pleurales (dP). Carril 1, control con ADN de *E histolytica* HM1:IMSS; carril 2, control con ADN de *E dispar* SAW 760; carril 3, control de H₂O; carriles 4-11, ADN de diferentes drenados; (carril 4, muestra dH-A92; carril 7, muestra dH-A95, carril 8, dP-A45; carril 11, dH muestra A97); carril 12, marcador de pesos (PCR markers, Promega).

Los 4 amplificados mostrados en la Figura 6 fueron purificados, reamplificados y secuenciados por el método de Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos obtenidas y su alinamiento se muestran en el Anexo III.

A

U78319	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EVKPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
Eh-HM1	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EVKPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
A92-dH	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
A95-dH	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
A45-dP	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
A97-dH	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI

B

U78319	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EVKPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
Eh-HM1	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EVKPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
PV- (tf)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
FG- (q)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
FG- (tf)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
RO- (q)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EVKPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI
RO- (tf)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	-----	-----	EPEVSI
EV- (SD)	KPGDFF	EKSPDSS	ESKHESSE	EIKPDSS	ESKHESSE	-----	-----	EIKPDSS	ESKHESSE	EPEVSI

Figura 7. Alineamiento de las secuencia de nucleótidos traducida de los segmentos polimórficos del gen de las quitinasas, procedente de **A:** drenado hepático (dH) o drenado pleural (dP) de diferentes pacientes (A92, A95, A45 y A97) y **B:** trofozoítos (tf), quistes (q) o evacuación de un paciente con síndrome diarreico (SD) de diferentes personas (PV, FG, RO, EV). Las secuencias están acomodadas en grupos de heptapéptidos con igual secuencia de aminoácidos para facilitar su análisis. U78319, secuencia de *E histolytica* HM1:IMSS reportada en el gene bank. Eh-HM1, secuencia de *E histolytica* HM1:IMSS obtenida en el laboratorio.

Para facilitar su análisis, las secuencias de nucleótidos fueron traducidas y alineadas. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 7A y podemos ver que la secuencia reportada en el Gen Bank para la cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS, es la misma que nosotros encontramos para esta misma cepa cultivada en el laboratorio. Además, la secuencia de las 4 muestras analizadas es igual entre ellas, pero menor que la de la cepa control como se observa en el gel (Figura 6) ya que carecen de 2 heptapéptidos que están presentes en la cepa control.

Para el caso del gen de las proteínas ricas en serina, la diferencia en los tamaños de los amplificados obtenidos con los iniciadores NSRPEh, en algunos casos fue muy evidente (Figura 8), mientras que en otros la diferencia fue pequeña (Figura 9). Un dato que vale la pena resaltar fue el obtenido con el paciente A45. Este paciente ingresó al hospital por un absceso hepático mixto que drenó espontáneamente a pleura; este hecho permitió obtener tanto drenado hepático como drenado pleural, los cuales se procesaron en forma independiente. La muestra pleural de este paciente amplificó con todos los iniciadores, mientras que la muestra hepática solo amplificó con los iniciadores Psp y nSRPEh (Tabla 10). Llama la atención que con los iniciadores nSRPEH el amplificado obtenido con el ADN del drenado pleural haya sido de diferente tamaño que el obtenido con el ADN del material del absceso hepático, como se muestran en la Figura 8 (carriles 3 y 4).

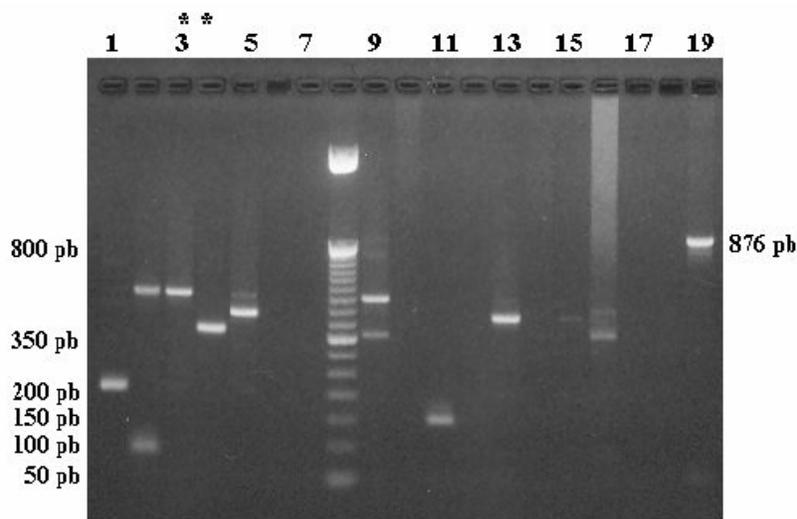


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores nSRPEh y el ADN de diferentes drenados hepáticos y pleurales. Carril 1-7 y 9-15, ADN de diferentes drenados hepáticos; carril 8, Marcador de pesos (50 bp DNA ladder, Invitrogen); carril 16, control con ADN de *E. histolytica* HM1:IMSS; carril 17, control con ADN de *E. dispar* SAW 760; carril 18, control de H₂O; carriles 19, marcador de 876 pb. * Muestras del paciente A45 (carril 3, drenado pleural; carril 4, drenado hepático).

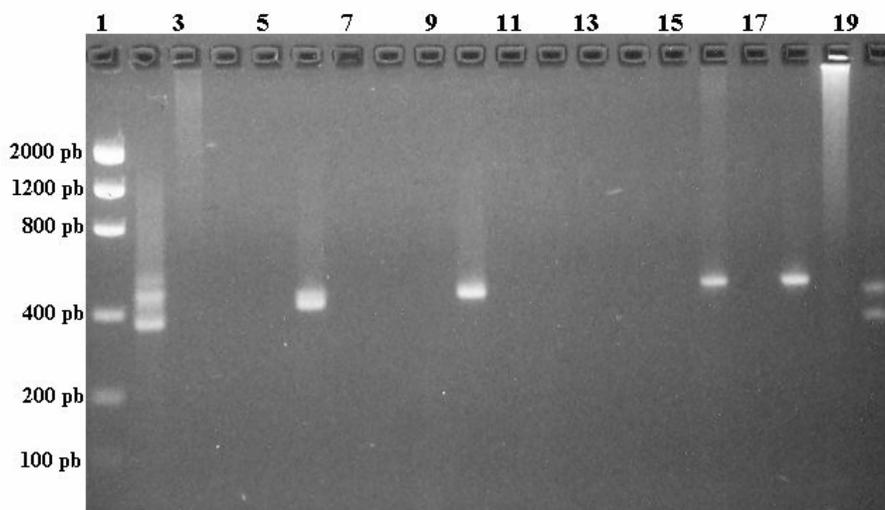


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores nSRPEh y el ADN de diferentes drenados hepáticos y pleurales. Carriles 1, marcador de pesos (Low DNA mass ladder, Invitrogen); carriles 2-4, controles con ADN de *E histolytica* HM1:IMSS, *E dispar* SAW 760 y H₂O; carriles 5-20, ADN de diferentes drenados hepáticos.

Portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Para el caso de los portadores asintomáticos de *E. histolytica*, solo se mostrarán los resultados mas relevantes y representativos de los obtenidos hasta este momento. Como se mencionó en la sección anterior las muestras de heces fueron sembradas en medio de cultivo de Robinson y los trofozoítos que crecieron fueron cosechados por centrifugación. De igual forma, los quistes presentes en las muestras de heces fueron concentrados mediante una técnica de centrifugación. Tanto de los trofozoítos como de los quistes se extrajo el ADN que posteriormente se utilizó para hacer amplificaciones con los iniciadores mencionados en la sección anterior.

Los resultados obtenidos de las amplificaciones con los iniciadores RD y el ADN de quistes y trofozoítos procedentes de portadores asintomáticos se encuentran en la Figura 10, donde se observa que casi todas las muestras amplificaron con estos iniciadores. Posteriormente, se determinó que el parásito aislado de los portadores PV, RO y FG, correspondía a *E. histolytica* ya que el ADN extraído tanto de los quistes como de los trofozoítos, amplificó con los iniciadores Psp y no así con los iniciadores NPsp (Figura 11). Los resultados de la amplificación con los iniciadores SRPEh se muestran en la Figura 12, donde se observa que las 6 muestras dieron una banda de tamaño similar a la del control de *E. histolytica*. Cuando el ADN de estas muestras fue amplificado con los iniciadores CHI obtuvimos resultados interesantes que se muestran en la Figura 13.

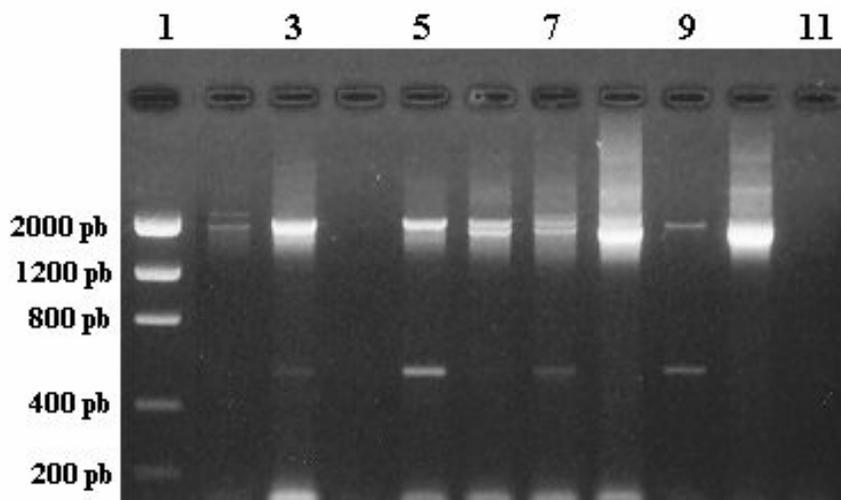


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores RD y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Carril 1, marcador de pesos (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen); carril 2, ADN de quistes de paciente C389; carril 3, ADN de trofozoítos del paciente PV; carril 4, ADN de quistes de paciente PV; carril 5, ADN de trofozoítos del paciente RO; carril 6, ADN de quistes de paciente RO; carril 7, ADN de trofozoítos del paciente FG; carril 8, ADN de quistes de paciente FG; carriles 9-11, ADN de quistes de los pacientes MRB, MRO y BG.

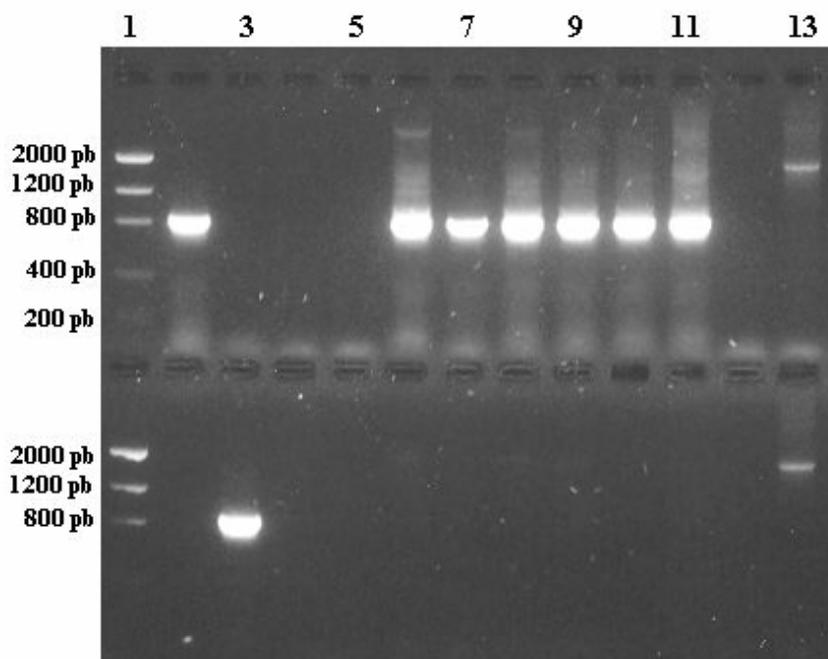


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores Psp (gel superior) y NPsp (gel inferior) y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Carril 1, marcador de pesos (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen); carril 2-4, controles *E. histolytica* HM1:IMSS, *E. dispar* SAW 760 y H₂O; carril 5, ADN de quistes de paciente C389; carril 6, ADN de trofozoítos del paciente PV; carril 7, ADN de quistes de paciente PV; carril 8, ADN de trofozoítos del paciente RO; carril 9, ADN de quistes de paciente RO; carril 10, ADN de trofozoítos del paciente FG; carril 11, ADN de quistes de paciente FG; carriles 12-14, ADN de quistes de los pacientes MRB, MRO y BG.

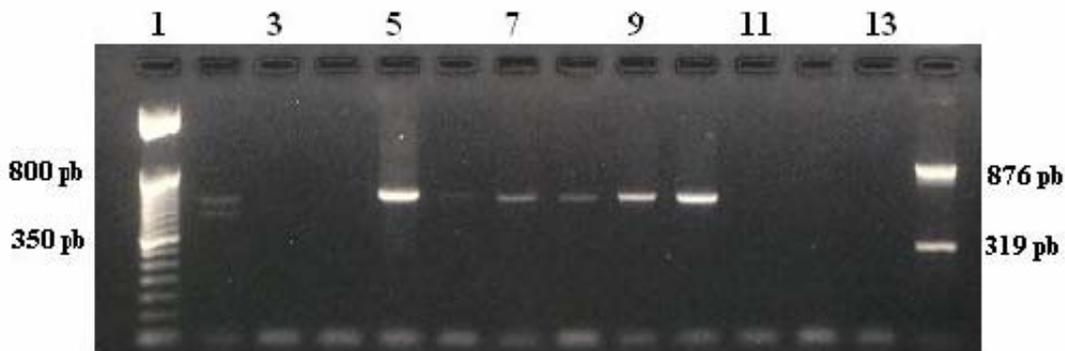


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores SRPEh y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Carril 1, marcador de pesos (50 bp DNA Ladder, Invitrogen); carril 2 - 4, controles de *E. histolytica* HMI:IMSS, *E. dispar* SAW 760 y H₂O; carril 5, ADN de trofozoítos del paciente PV; carril 6, ADN de quistes de paciente PV; carril 7, ADN de trofozoítos del paciente RO; carril 8, ADN de quistes de paciente RO; carril 9, ADN de trofozoítos del paciente FG; carril 10, ADN de quistes de paciente FG; carriles 11-13, ADN de quistes de los pacientes C210, C257 y C353 respectivamente; carril 14, marcador de 876 y 319 pb.

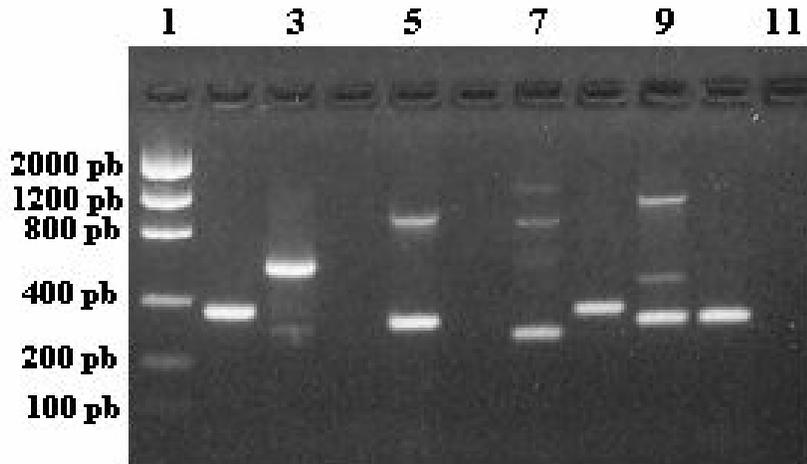


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución TBE de los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores CHI y el ADN de trofozoítos o quistes de portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Carril 1, marcador de pesos (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen); carril 2 - 4, controles de *E. histolytica* HMI:IMSS, *E. dispar* SAW 70 y H₂O; carril 5, ADN de trofozoítos del paciente PV; carril 6, ADN de quistes de paciente PV; carril 7, ADN de trofozoítos del paciente RO; carril 8, ADN de quistes de paciente RO; carril 9, ADN de trofozoítos del paciente FG; carril 10, ADN de quistes de paciente FG.

Podemos ver que el ADN de las cepas control de *E. histolytica* HMI:IMSS y *E. dispar* SAW 760 generaron los amplificados del tamaño esperado (319 y 528 pb respectivamente). Se observa también, que el ADN de los trofozoítos y quistes procedentes del paciente FG, generaron una banda de igual tamaño (carriles 9 y 10, Figura 13). Una banda del mismo tamaño también se observó con el ADN de trofozoítos del paciente PV (carril 5); sin embargo con el ADN procedente de los quistes de este mismo paciente no obtuvimos ninguna banda (carriles 6). El dato interesante es el obtenido con el ADN de trofozoítos y quistes del paciente RO, ya que los amplificados

son de diferente tamaño; el amplificado obtenido con el ADN de trofozoítos es ligeramente menor que los otros 3 amplificados antes mencionados (PV-tf, FG-tf, FG-q), mientras que el obtenido con el ADN procedente de los quistes es ligeramente mayor (carriles 7 y 8, Figura 13). Todos estos amplificados obtenidos con los iniciadores CHI se purificaron, reamplificaron y secuenciaron por el método de Big Dye (Applied Biosystem, Foster City, CA). Las secuencias de nucleótidos obtenida se muestran en el Anexo III. De la misma forma que como en el caso de las muestras provenientes de drenados hepáticos, las secuencias de nucleótidos fueron traducidas y alineadas para facilitar su análisis. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos se muestran en la Figura 7B. Podemos ver que la secuencia de la cepa de *E. histolytica* HM1, es la misma que la que nosotros encontramos en los quistes del paciente RO; es decir, ambas regiones polimórficas están constituidas por 8 heptapéptidos, acomodados en el mismo orden. Las secuencias obtenidas de los trofozoítos del paciente PV y de los quistes y trofozoítos del paciente FG, son iguales entre si, pero más pequeñas que las de la cepa HM1 ya que tiene 2 heptapéptidos menos. Finalmente, la secuencia obtenida de los trofozoítos de los quistes del paciente RO es la de menor tamaño ya que tiene 4 heptapéptidos menos que la cepa HM1. El dato interesante es que la secuencia de los quistes y trofozoítos del paciente RO es distinta.

Patrones o Genotipos de Quitinasas. Si analizamos las secuencias de los segmentos polimórficos de las quitinasas podemos destacar varias cosas. De los 10 patrones obtenidos, 8 son iguales (presentan 6 heptapéptidos) y fueron obtenidos de 5 casos de procesos invasores (3 abscesos hepáticos, 1 invasión pleural y 1 síndrome diarreico) y en 3 casos de quistes y/o trofozoítos de portadores asintomáticos (Figuras 7A y 7B) . Es conveniente aclarar que hasta antes de este estudio, el genotipo H no había sido reportado o identificado en otra parte del mundo (Nº acceso GenBank EF445962). Los otros 2 patrones identificados son de los quistes y trofozoítos del individuo RO mencionado en el párrafo anterior. Uno de los patrones es igual al reportado para la cepa HM1 de *E. histolytica* y posee 8 heptapéptidos y el otro patrón es más corto y posee solo 4 heptapéptidos (similar a la cepa NIH-200 y a una cepa de Calcuta [33, 34]).

DISCUSIÓN

Emil Brumpt en 1925 fue el primero en utilizar el nombre de *Entamoeba dispar* para describir un tipo de amiba que podía infectar a las personas sin causarles ningún daño y distinguirla de *Entamoeba histolytica*, agente causal de la disentería amibiana y otros padecimientos extra-intestinales [17]. Circunstancialmente su propuesta no tuvo eco en la comunidad científica de la época y no fue sino a partir de la década de los 70s que comenzó a acumularse evidencia a favor de la propuesta de Brumpt. Las amibas aisladas de personas enfermas podían distinguirse de las aisladas de individuos sanos por su capacidad de aglutinar con ciertas lectinas [47], por sus patrones isoenzimáticos [61], por sus diferencias antigénicas [64] y por sus diferencias a nivel de ADN [21, 69]. Todo esto condujo a que la comunidad científica adoptara a *E. dispar* como una especie distinta de *E. histolytica* [28], lo cual posteriormente también fue aceptado por la Organización Mundial de la Salud en 1997 [76]. Este hecho aparentemente tan simple fue de suma importancia ya que hizo que se tuviera que revalorar muchos de los estudios epidemiológicos que no consideraban la existencia de 2 especies diferentes de *Entamoeba*: *E. histolytica* y *E. dispar*. Además, hizo necesaria la utilización de técnicas que permitieran identificar y distinguir a las 2 especies [32, 37, 68].

En la actualidad ya se han realizado algunos estudios para determinar la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en algunas regiones del mundo. De esta forma, se ha visto que en lugares como Suecia [41], Italia [15] y Grecia [74], la frecuencia de infección por *E. dispar* es mayor que la de *E. histolytica*. También se ha visto que en otros lugares como Nicaragua [42], Etiopía [39] y Ghana [68], donde se consideraba que la infección por *E. histolytica* era muy alta, después de utilizar técnicas que permitían diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar*, se encontró que la infección por *E. histolytica* estaba sobrediagnosticada y que la incidencia de *E. dispar* era mayor que la de *E. histolytica*. En nuestro caso, en las comunidades del estado de Morelos que estudiamos, encontramos que la frecuencia de infección por *E. histolytica* es mayor que la de *E. dispar*. Nuestros resultados contrastan con lo observado en otras partes del mundo, pero concuerdan con lo

observado en México por Acuña en un estudio realizado en una comunidad del estado de Chiapas [2] y con lo reportado por Newton [48] en un estudio realizado en el Hospital Infantil de México. Además, algunos estudios en Durban, Sudáfrica, muestran también que la frecuencia de infección por *E. histolytica* es mayor que la de *E. dispar* [12], al igual que en algunos lugares de Asia, tanto en hospitales para personas con retraso mental como entre homosexuales [49, 57, 66].

Estas diferencias que se observan en la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en diferentes partes del mundo, consideramos que obedecen a adaptaciones de los organismos (*E. histolytica*, *E. dispar* y el humano) a los distintos nichos ecológicos en las diferentes regiones geográficas. No son iguales las condiciones sociodemográficas, la frecuencia de infección, ni la morbilidad en México que en Etiopia, Irán o Filipinas. En este sentido, en los 3 estudios realizados en México, además de la mayor incidencia de *E. histolytica* que de *E. dispar*, también se reportan considerable número de infecciones mixtas, sin embargo ni en Suecia [41] ni en Filipinas [55] se han reportado infecciones mixtas. Además, durante el año y medio de trabajo de campo durante el cual estuvimos colectando muestras de las 2 comunidades no se detectaron casos de amibiasis invasora a pesar de la alta prevalencia de la infección; este hecho contrasta con lo reportado en Bangladesh donde el 20% de los casos de infección por *E. histolytica* desemboca en enfermedad [36]. De igual forma, en otro estudio realizado en Bangladesh se encontró que el 21% de los niños estudiados eran portadores de *Entamoeba moshkovskii* [3] (amiba no patógena para el humano), hecho que no se ha observado en otras partes del mundo, aunque hay que tener cuidado con la interpretación de este hallazgo ya que bien pudiera ser que este hecho no se ha investigado de manera intencional en otras comunidades. En nuestra opinión, las cepas de *E. histolytica* que se localizan en estas 2 comunidades del estado de Morelos son de baja virulencia y es por esta razón que no se observa una mayor morbilidad de procesos invasores con manifestaciones clínicas aparentes.

Después de la identificación y aceptación en 1997 de *E. dispar* como una especie no patógena y distinta de *E. histolytica*, se continuó observando que no todas las personas infectadas con *E. histolytica* desarrollaban procesos invasores. Uno de los factores que se ha considerado que puede influir en este hecho además de los relacionados a la

resistencia y/o susceptibilidad del huésped, es la existencia de variantes dentro de la especie de *E. histolytica* con diferente grado de virulencia como se mencionó en el párrafo anterior. El estudio de la amiba y de su genoma en términos generales, ha permitido identificar algunos segmentos de su ADN que tienen la característica de poseer segmentos repetidos en serie como los presentes en los genes que codifican para la proteína rica en serina y la quitinasa [27, 63]. Posteriormente, el análisis de estos genes mostró que podían ser de utilidad en la identificación de variantes intraespecie [23, 60]. Por este motivo, nuestro grupo decidió estudiar el polimorfismo de los genes de la quitinasa y la proteína rica en serina en las amibas identificadas en las 2 comunidades del estado de Morelos, así como de las causantes de procesos invasores en pacientes que ingresaron a los hospitales con los cuales se había establecido una colaboración. Vale la pena aclarar que en la actualidad ya se han descrito otros marcadores moleculares que han mostrado ser de utilidad en la identificación de variantes [5, 78, 79] y algunos de éstos, como los asociados a los denominados *locus* 1-2 y 5-6, también se están utilizando en el laboratorio de la Dra. Ximénez.

Por razones que todavía no comprendemos, la amiba que creció en forma mayoritaria en el medio de Robinson cuando se sembró con las muestras de heces de las comunidades, fue *E. dispar*. Si bien este hecho parece raro, también ha sido reportado por otros investigadores [48]. Además, este mismo medio sembrado con muestras de heces de pacientes del Hospital General o sus familiares, permitió el crecimiento de *E. histolytica*. Estos aislados de *E. dispar*, procedentes de cultivo de Robinson representaron una fuente importante de material para la obtención de ADN y poder caracterizar al parásito. Como ya se mencionó anteriormente, *E. dispar* es un organismo que no causa daño alguno en el humano y que aunque no ha recibido la misma atención que *E. histolytica*, por el hecho de que ambos parásitos poseen muchas características en común, el estudio de *E. dispar* nos puede ayudar a entender mejor a *E. histolytica*.

El polimorfismo entre algunas cepas de *E. dispar* provenientes de diferentes partes del mundo (Calcuta, San Diego y México) fue reportado por Ghosh en el año 2000 [33]. Por su parte, Zaki y col. [80] también observaron un gran polimorfismo en los aislados de *E. dispar* de Sudáfrica, al analizar los segmentos repetidos en serie asociados a los genes del ARN de transferencia (*locus* 1-2 y 5-6).

Nosotros en este trabajo, también observamos un gran polimorfismo al estudiar los segmentos repetidos del gen de la quitinasa y de la proteína rica en serina en los aislados de *E. dispar* de las 2 comunidades del estado de Morelos (Tablas 5 y 6). Si tomamos en cuenta ambos marcadores a pesar del número relativamente pequeño de muestras analizadas, podemos ver que algunos genotipos se localizan principalmente en una u otra de las comunidades y que también es posible diferenciar los aislados provenientes de una misma comunidad (Tablas 7 y 8). También pudimos observar que algunos individuos portan al parásito con el mismo genotipo en muestras obtenidas con 2-6 meses de diferencia lo que habla de infecciones persistentes (Tabla 9, individuos 717.01, 2026.11, 2057.02) y que otras personas portan al parásito con diferente genotipo en distintas etapas del estudio, lo que nos habla de reinfecciones con distinta cepa (Tabla 9, individuos 543.09). De igual forma observamos que algunos miembros de una misma familia albergan indistintamente el mismo genotipo (Tabla 9, familia 546) o distinto genotipo del parásito (Tabla 9, familias 739 y 607), tanto dentro de la misma como en distintas etapas del estudio lo que nos da información sobre la fuente de infección. Consideramos que todos estos datos son importantes desde el punto de vista epidemiológico para entender la distribución y transmisión del parásito en la comunidad. Un caso particular es el del individuo 607.10 (Tabla 9) del que se aisló al parásito con distinto genotipo en muestras tomadas con 1 a 7 días de diferencia. Aunque no podemos descartar una reinfección por una cepa con otro genotipo, debido al lapso de tiempo tan corto entre una y otra muestra, bien podría tratarse de una coinfección con cepas que poseen diferente genotipo. Zaki y col. [80] observaron algo similar en *E. histolytica*, pero en su caso el lapso de tiempo entre las 2 muestras fue de 1 mes, por lo que los autores se refieren a este fenómeno como infección transitoria. Aunque ese fuera el caso, esto implica que en determinadas circunstancias un huésped puede albergar al mismo tiempo 2 cepas de la misma especie con distinto genotipo. No sabemos que tan frecuente pudiera ser este fenómeno o su relevancia en el caso de la infección por *Entamoeba*, pero si creemos que debería ser investigado más a fondo. Además, la infección policlonal por parásitos no es una propuesta nueva ya que se ha descrito en infecciones por *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma* [25, 38, 73].

En relación a los portadores asintomáticos de *E. histolytica*, si bien el estudio no ha concluido, con las muestras provenientes de pacientes del Hospital General y sus familiares podemos señalar algunos puntos. Al igual que Zaki y col. [81] aunque usando algunos marcadores distintos, nosotros encontramos que en general el genotipo de los quistes de *E. histolytica* obtenidos de las heces de una persona es el mismo que el de los trofozoítos que crecen cuando esas heces son sembradas en medio de cultivo (Cultivo de Robinson). Tal es el caso del individuo FG, en el cual se observa que los amplificadores producidos con el ADN de quistes o trofozoítos y los iniciadores nSRPEh fueron del mismo tamaño (Figuras 12) y lo mismo sucedió con los iniciadores CHI (Figura 13). Además, la secuencia de nucleótidos y aminoácidos en el segmento polimórfico de la quitinasa también fue igual (Anexo III y Figura 7B). En otros casos como con el individuo PV, el ADN proveniente generalmente de quistes no amplificó con todos los iniciadores y por lo tanto no pudo hacerse una comparación completa.

El individuo RO representa un caso particular ya que si bien los amplificadores obtenidos con los iniciadores SRPEH y el ADN tanto de quistes como de trofozoítos son del mismo tamaño (Figura 12), los obtenidos con los iniciadores CHI son de distinto tamaño (Figura 13) al igual que su secuencia (Anexo III y Figura 7B). Los segmentos polimórficos tanto de las proteínas ricas en serina como de las quitinasas han mostrado ser estables a través del tiempo así como al ser sujetos a procedimientos de congelación-descongelación, adaptación a medios de cultivo monoxénicos y/o axénicos, pase por animales, etc [19, 23, 33]. Si bien no podemos descartar que este cambio sea debido a una mutación, si podría considerarse un fenómeno poco probable. En este sentido sería conveniente secuenciar el segmento polimórfico de las proteínas ricas en serina (o por lo menos determinar su patrón de restricción con *Alu I*) tanto de los quistes como de los trofozoítos obtenidos del individuo RO ya que se ha visto que algunos amplificadores con el mismo tamaño cuando se secuencian revelan un genotipo distinto [34]. Ésto, nos daría mayores elementos para determinar si este caso se trata de una mutación o no. Además, en la mayoría de aislados de *E. histolytica* se ha visto que el locus del gen de las quitinasas es homocigoto y en los casos en que no es así, se observan dobles bandas en los geles de los amplificadores [35] lo cual no sucedió en nuestro caso. Nosotros pensamos que la infección por *E. histolytica* en algunas personas como RO, puede ser policlonal y que son las condiciones de cultivo o

manejo de las muestras las que ejercen una presión de selección sobre las clonas del parásito, que no necesariamente se encuentran en igual proporción en las muestras analizadas. De esta forma el medio de cultivo permitió el crecimiento de una clona y los quistes que se concentraron pertenecen a otra clona. De momento no podemos probar plenamente nuestra hipótesis y sería necesario analizar otros marcadores y un mayor número de muestras, aunque, esta hipótesis concuerda con los fenómenos de selección, competencia y simbiosis que se ha descrito ocurren en el tubo digestivo [85]. Además, de las 6 secuencias del segmento polimórfico del gen de la quitinasa de cepas de *E. histolytica* aisladas del tubo digestivo, 4 tienen el mismo genotipo (genotipo H, Figura 7B) que como se mencionó en la sección anterior, no ha sido reportado en otras partes del mundo (Gen Bank EF445962).

Con relación a los abscesos hepáticos amibianos y mixtos, nos llama la atención que no todas las muestras del ADN obtenidas hayan amplificado con todos los iniciadores utilizados, como se muestra en la Tabla 10. Sin embargo, fenómenos similares también han sido observados por otros grupos de investigadores [40, 43, 83]. Unas de las explicaciones a este fenómeno es la diferente sensibilidad de los distintos iniciadores que se han utilizado en todos estos estudios [54, 84], además de la diferencia en el proceso de extracción del ADN [8, 82]. Sin embargo, por lo menos en nuestras manos, estos diferentes métodos de extracción de ADN no mostraron ventaja alguna sobre los métodos utilizados por nosotros y descritos en la sección de material y métodos (datos no mostrados). Otro factor que consideramos puede estar influyendo en la falta de resultados positivos en el PCR con algunas muestras, es la naturaleza misma del material biológico del que se parte, ya que el absceso hepático es un material necrótico producto de la degradación y digestión de las células y tejido, principalmente del huésped. Por otro lado, en el manejo del paciente en el hospital, cuando se sospecha que puede tener un absceso de naturaleza infecciosa (piógeno y/o amibiano) se instituye de inmediato el tratamiento con antibióticos y amebicidas, y existen reportes que sugieren que este tratamiento influye sobre la posibilidad de observar y aislar al parásito [67] y la eficiencia del PCR [59], en ambos casos a partir del drenado del absceso hepático.

A pesar de que el trabajo en relación a los abscesos hepáticos amibianos no ha concluido y de que los datos con los que se cuenta son escasos, se pueden destacar algunos hechos

que consideramos importantes. Los 4 genotipos de las cepas responsables de procesos invasores extraintestinales son iguales (Figura 7A) y corresponden al nuevo genotipo (genotipo H) identificado por nuestro grupo. Si bien a primera vista parecería que existe una preponderancia de este genotipo en cepas responsables de procesos invasores extraintestinales, creemos que hay que ser cuidadosos porque son pocas las muestras que hemos secuenciado además de que en los gels de los productos de PCR se pueden ver bandas que tienen tamaños distintos. Otro dato que vale la pena resaltar es el relacionado al paciente A45 y los iniciadores nSRPEh. Como se mencionó en la sección anterior, el amplificado obtenido con el ADN del drenado hepático es de diferente tamaño al obtenido con el ADN del drenado pleural. Ghosh [33] y Haghghi [34, 35], en forma independiente, observaron que algunos de los aislados que analizaron son heterocigotos para el locus de las proteínas ricas en serina. Sin embargo, creemos que ese no es el caso del paciente A45 ya que cuando se amplifican genes polimórficos heterocigotos lo que se observa son dobles bandas como es el caso de la cepa HM1 de *E. histolytica* o las muestras correspondientes a los carriles 6 y 20 de la Figura 9. En nuestra opinión, se trata nuevamente de una probable infección policlonal por *E. histolytica* y además, bien podría incluso especularse sobre la posibilidad aún no explorada de organotropismo de cepas de *E. histolytica*. Nos queda claro que los datos que tenemos no son concluyentes y que desde luego no prueban nuestra hipótesis. Sin embargo, este estudio abre un campo por demás interesante que es la epidemiología molecular tanto de la infección como de la enfermedad amibiana. Nuestros resultados apuntan a que estamos en el camino del análisis y la comprensión del complejo fenómeno de la relación huésped parásito en la amibiasis humana.

CONCLUSIONES

- En las 2 comunidades estudiadas, la prevalencia de *Entamoeba histolytica* fue mayor que la de *Entamoeba dispar*.
- *Entamoeba dispar* mostró tener un gran polimorfismo en los genes de la quitinasa y la proteína rica en serina.
- Los genotipos de *Entamoeba dispar* mostraron su potencial de utilidad en estudios epidemiológicos.
- Algunas cepas de *Entamoeba histolytica* detectadas en este estudio, poseen un genotipo hasta ahora único en el mundo del gen de las quitinasas (genotipo H).
- Nuestros resultados apoyan la sugerencia de que la infección en humanos, tanto por *Entamoeba histolytica* como por *Entamoeba dispar*, en algunos casos puede ser policlonal.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackers J, Mirelman D, 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 9: 367-373.
2. Acuña-Soto R, Samuelson J, Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F, Schoolnick G, Wirth D, 1993. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*, 48: 58-70.
3. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA, Haque R, Clark CG, 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children in Bangladeshi. *Emerg Infect Dis*, 9: 580-584.
4. Ali IKM, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA, Clark CG, 2007. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 45: 285-289.
5. Ali IKM, Zaki M, Clark CG, 2005. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 43: 5842-5847.
6. Ash RL, Orihel TC, 1987. Collection and preservation of faeces. American Society of Clinical Pathologists, eds. *Parasites: a guide to laboratory procedures and identification*. Chicago, IL: ASCP Press, 5-14.
7. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1995. *Current protocols in molecular biology*, Vol 1 pp: 2.1.1- 2.1.3. John Wiley & Sons, Inc.
8. Ayeh-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA, Haque R, 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp Parasitol*, 99: 80-88.
9. Baptiste E, Brinkman H, Lee JA, Moore DV, Sensen CW, Gordon P, Duruflé L, Gaasterland T, Lopez P, Müller M, Philippe H, 2002. The analysis of 100 genes support the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba* and *Mastigamoeba*. *Proc Natl Ac Sci USA*, 99: 1414-1419.
10. Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S, 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*, 30: 401-410.
11. Blanc DS, 1992. Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* zymodemes using isoenzyme analysis. *J Protozool* 39: 471-479.
12. Blessman J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, Abd-Alla MD, Jackson TFH, Ravdin J, Tannich E, 2002. Real time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol*, 40: 4413-4417.
13. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TFHG, Stanley SL, 1991. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol*, 29: 696-701.

14. Caballero-Salcedo A, Viveron-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L, 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 50: 412-419.
15. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C, 2006. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100: 450-457.
16. Clark CG, 1993. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by riboprinting. In: Persing, C., Smith, T.E., White, T.J. (Ed.), *Diagnostic molecular microbiology*. ASM Press, Washington D.C., pp. 468-474.
17. Clark CG, 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92: 361-364.
18. Clark CG, 2000. The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. *Res Microbiol*, 151: 599-603.
19. Clark CG, 2006. Methods for the investigation of diversity in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 7: 258-262.
20. Clark CG, Ali IKM, Kaki M, Loftus BJ, Hall N, 2006. Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 146: 24-29.
21. Clark CG, Diamond LS, 1991. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol*, 49: 297-302.
22. Clark CG, Diamond LS, 1992. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch Med Res*, 23: 15-16.
23. Clark CG, Diamond LS, 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol*, 77: 450-455.
24. Corpet F, 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16: 10881-10890.
25. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernández V, Saravia N, Fernandes O, 2004. *Leishmania* (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol*, 108: 59-66.
26. Davis PH, Schulze J, Stanley SL, 2007. Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol*, 151: 118-128.
27. De la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S, Samuelson J, 1997. Cloning and expression of chitinases of *Entamoeba*. *Mol Biochem Parasitol*, 85: 139-147.

28. Diamond LS, Clark CG, 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walter, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Euk Microbiol*, 40: 340-344.
29. Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA, 2004. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis*, 189: 520-526.
30. Edman u, Meraz MA, Rausser S, Agabian N, Meza I, 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 172: 879-888.
31. Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N, 2001. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitol Int*, 50: 185-189.
32. Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula, Vakalis N, 2000. A nested, multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *Ann Trop Med Parasitol*, 94: 233-240.
33. Ghosh S, Frisardi M Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez OA, Santos-Preciado JI, Ganguly C, Lohia A, Reed S, Samuelson J, 2000. Molecular epidemiology of *Entamoeba spp.*: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol*, 38: 3815-3821.
34. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G, Nozaki T, 2002. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*, 40: 4081-4090.
35. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T, 2003. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol*, 41: 3748-3756.
36. Haque R, Duggal P, Ali IM, Hossain MB, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA, 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladeshi children. *J Infect Dis*, 186: 547-552.
37. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petry WA, 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection Kits. *J Clin Microbiol*, 33: 2558-2561.
38. Kassberger F, Birkenmaier A, Khattab A, Kreinsner PG, Klinkert MQ, 2002. PCR typing of *Plasmodium falciparum* in matched peripheral, placental and umbilical cord blood. *Parasitol Res*, 88: 1073-1079.
39. Kebede A, Verweij J, Dorigo-Zetsman W, Sanders E, Messele T, Van Lieshou L, Petros B, Polderman T, 2003. Overdiagnosis of amoebiasis in the absence of *Entamoeba histolytica* among patients presenting with diarrhoea in Wonji and Akaki, Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97: 305-307.

40. Khan U, Mirdha BR, Samantaray JC, Sharma MP, 2006. Detection of *Entamoeba histolytica* using polymerase chain reaction in pus samples from amebic liver abscess. *Indian J Gastroenterol*, 25: 55-57.
41. Lebbad M, Svärd SG, 2005. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. *Scand J Infect Dis*, 37: 680-685.
42. Leyva B, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E, 2006. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res*, 37: 529-534.
43. Linder E, Isagulians M, Olsson M, Lundin L, Zindrou S, Corrales E, Tellez A, Leiva B, Morles W, Rivera T, Cabrera JM, 1997. Amebiasis in León, Nicaragua: *Entamoebae* in stool examination and identification of amebic liver abscess cases by serology and PCR. *Arch Med Res*, 28 suppl: S314-S316.
44. Loffus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, Roncaglia P, Berrimn M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaki T, Suh B, Pop M, Duchene M, Ackers J, Tannich E, Leippe M, Hofer M, Bruchhaus I, Willhoeft U, Bhattacharya A, Chillingworth T, Churcher C, Hance Z, Harris B, Harris D, Jagels K, Moule S, Mungall K, Ormond D, Squares R, Whitehead S, Quail MA, Rabinowitsch E, Norbertczak H, Price C, Wang Z, Guillen N, Girlchrist C, Stroup PG, Bhattacharya S, Lohia A, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Weber C, Singh U, Mukherjee C, El-Sayed NM, Petri WA, Clark CG, Embley TM, Barrell B, Fraser CM, Hall N, 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433: 865-868.
45. MacFarlane RC, Singh U, 2006. Identification of differentially expressed genes in virulent and non virulent *Entamoeba* species: potential implication for amebic pathogenesis. *Infect Immun*, 74: 340-351.
46. Mai Z, Ghosh S, Frisardi M, Rosenthal B, Rogers R, Samuelson J, 1999. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion derived organelle (crypton) in the microserophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol*, 19: 2198-2205.
47. Martínez-Palomo A, González-Robles A, De la Torre M, 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by ConA. *Nature New Biology*, 245: 186-187.
48. Newton-Sanchez O, Sturm-Ramírez K, Romero-Zamora JL, Santos-Preciado JI, Samuelson J, 1997. High rate of occult infection with *Entamoeba histolytica* among non-dysenteric mexican children. *Arch Med Res*, 28 suppl: 311-313.
49. Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T, Haghghi A, 2006. Diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. *Arch Med Res*, 37: 277-279.
50. Padilla-Vaca F, Ankri S, Bracha R, Koole LA, Mirelman D, 1999. Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodaltons) subunit of the Gal/GalNAc lectine. *Infect Immun*, 65: 2096-2102.

51. Pérez-Rodríguez M, Arellano J, López-Osuna M, Velázquez J, Granados J, Justiniani N, Santos JI, Madrazo A, Muñoz L, Kretschmer R, 1997. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo children with amebic abscess of the liver and summary of our overall HLA-SC01 experience in invasive amebiasis. Arch Med Res, 28 suppl: S245-S247.
52. Petri WA, Haque R, Lyerly D, Vines RR, 1999. Estimating the impact of amebiasis on health. Parasitol Today, 16: 320-321.
53. Petry WA, Jackson TFHG, Gathiram V, Lress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, Mirelman D, 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectine. Infec Immun, 58: 1802-1806.
54. Prakash A, Chakraborti A, Mahajan RC, Ganguly NK, 2000. *Entamoeba histolytica*: rapid detection of indian isolates by cysteine proteinase gene-specific polymerase chain reaction. Exp Parasitol, 95: 285-287.
55. Rivera W, Tachibana H, Kanbara H, 1998. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the norther Philippines as detected by polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 59: 916-9121.
56. Reed SL, Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Stroehel VL, Carlton JE, Diedrich DL, Torian BE, 1992. Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. Infect Immun, 60: 542-549.
57. Rivera WL, Santos SR, Kanbara H, 2006. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. Parasitol Res, 98: 106-110.
58. Robinson GL, 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans R Soc Trop Med Hyg, 62: 285-294.
59. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IKM, Petry WA, Haque R, 2005. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba hitolytica* infetion. J Clin Microbiol, 43: 2168-2172.
60. Samuelson J, Caplivski D, Sturm-Ramírez K, Kretzinger K, Descoteaux S, Hernández G, Vargas G, Mammo R, Newton O, Santos J, De la Vega H, Robbins P, Ganguly C, Lohia A, 1997. A proposal for a molecular biologic system for classifying isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Arch Med Res, 28 suppl: 274-275.
61. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD, 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 72: 519-521.
62. Secretaria de Salud, 2001. Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Secretaría de Salud, México D.F., pp. 15-32.

63. Stanley SL, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E, 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. Proc Natl Acad Sci, 87: 4976-4980.
64. Strachan WD, Chiodini PL, Spice WM, Moody AH, Ackers JP, 1988. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Lancet 1, 561-563.
65. Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takeuchi T, Watanabe, 1991. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 29: 2234-2239.
66. Tachibana H, Kobayashi S, Nagakura K, Kaneda Y, Takeuchi T, 2000. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for mentally retarded in Japan. Parasitol Int, 49: 31-35.
67. Tachibana H, Kobayashi S, Okuzawa E, Masuda G, 1992. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. Int J Parasitol, 22: 1193-1196.
68. Tachibana H, Kobayashi S, Takekoshi M, Ihara S, 1991. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. J Infect Dis, 164: 825-826.
69. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH, 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 5118-5122.
70. Tanyuksel M, Petri WA, 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev, 16: 713-729.
71. Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I, 2006. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res, 134: 289-298.
72. Tovar J, Fisher A, Clark CG, 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol, 32: 1013-1021.
73. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Toster S, Moreira MC, Filho GB, Pina SD, 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. Am J Pathol, 156: 1805-1809.
74. Verweij J, Oostvogel, F, Brienen E, Nang-Beilfubah A, Ziem J, Polderman A, 2003. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. Trop Med Int Health, 8: 1153-1156.
75. Walsh JA, 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis, 8: 228-238.

76. WHO/PAHO/UNESCO, 1997. Report of a consultation of experts on amoebiasis. *Weekly Epidemiol Rec*, 72: 97-100.
77. Willhoeft U, Tannich E, 1999. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 99: 41-53.
78. Zaki M, Clark CG, 2001. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 39: 897-905.
79. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG, 2002. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol*, 40: 1271-1276.
80. Zaki M, Reddy SG, Jackson TFH, Ravdin JI, Clark CG, 2003. Genotyping of *Entamoeba* species in South Africa: diversity, stability, and transmission patterns within families. *J Infect Dis*, 187: 1860-1869.
81. Zaki M, Verweij JJ, Clark CG, 2003. *Entamoeba histolytica*: direct PCR based typing of strains using fecal DNA. *Exp Parasitol*, 104: 77-80.
82. Zaman S, Khoo J, Ahmed SWN, Khan MA, Hussain R, Zaman V, 2000. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 86: 724-728.
83. Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng-I W, Mirelman D, 1999. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 37: 3034-3036.
84. Zindrou S, Orozco E, Linder E, Téllez A, Björkman A, 2001. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene target PCR. *Acta Trop*, 78: 117-125.
85. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR, 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*, 134: 465-472.

ANEXO I