



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DINÁMICA DE LA INFECCIÓN Y LA MORBILIDAD POR *Entamoeba histolytica* Y
Entamoeba dispar, EN LA POBLACIÓN ESCOLAR DE TLALTIZAPAN ESTADO DE
MORELOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

LILIANA ROJAS VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, IPN
DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DINÁMICA DE LA INFECCIÓN Y LA MORBILIDAD POR *Entamoeba histolytica* Y
Entamoeba dispar, EN LA POBLACIÓN ESCOLAR DE TLALTIZAPAN ESTADO DE
MORELOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

LILIANA ROJAS VELÁZQUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, IPN
DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ROJAS VELÁZQUEZ LILIANA** con número de cuenta 94293674, con la tesis titulada **"DINÁMICA DE LA INFECCIÓN Y LA MORBILIDAD POR *Entamoeba histolytica* Y *Entamoeba dispar*, EN LA POBLACIÓN ESCOLAR DE TLALTIZAPAN ESTADO DE MORELOS"**, bajo la dirección de la **DRA. CECILIA TERESA XIMÉNEZ GARCÍA**:

Presidente: DR. PABLO MARAVILLA CAMPILLO
Vocal: DRA. LUISA FALCÓN ÁLVAREZ
Secretario: DRA. MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS
Suplente: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
Suplente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de julio de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU/Becario:348424/239901).

A los proyectos: PAPIIT,UNAM: IN226511 y CONACYT: 210C01-140990.

*A los miembros del Comité Tutor: Dra. Cecilia Teresa Ximénez García, Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas y Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau. A todos les agradezco infinitamente su asesoría, tiempo, paciencia, opiniones y conocimientos que ayudaron a construir, enriquecer y concluir este proyecto.
Gracias*

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Dra. Cecilia Ximénez por ser mi tutora y por todo su apoyo tanto académico como personal, por mostrarme el maravilloso mundo de la investigación y que la medicina no se limita a un hospital, que existen otras áreas en donde los médicos nos podemos desarrollar profesionalmente. Gracias por permitirme ser parte de su grupo.

Dra. Paty le agradezco de una forma tan especial el apoyo que siempre me ha brindado en todos los sentidos académico, laboral pero sobretodo personal, por hacerme sentir que puedo contar con usted en cualquier circunstancia.

Enrique gracias por estar ahí para escucharme y por tus consejos durante todo este tiempo.

Alicia Valadez gracias porque sin tu invaluable ayuda hubiera sido imposible la realización de esta trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio: Eric, Miriam, Tobías, Oswaldo, Valeria, Martha, Angeles, Dra. Emma, Male a quienes les agradezco su compañía, apoyo, confianza y los buenos momentos.

A todos los que se han interesado y han estado pendiente de mí durante esta etapa: Dra. Carmen, Malena.

Marco Gudiño por tu apoyo técnico pero sobre todo por tu amistad.

Lulú Alonso gracias por tu gran entusiasmo en el diseño de las imágenes.

A los miembros del Jurado: Dr. Pablo Maravilla Campillo, Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas, Dra. Luisa Falcón Álvarez, Dra. María Magdalena Aguirre García y Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau por el tiempo y espacio dedicado a la lectura de esta tesis, agradezco sus comentarios.

Al Dr. Alejandro Gómez por su ayuda en el análisis estadístico.

Al Dr. René Cerritos por su apoyo en el análisis de las secuencias.

Y de manera especial a todos los niños y familias que de manera voluntaria participaron en este estudio, ya que sin ellos este trabajo no existiría. Gracias

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, a todo el personal administrativo y académico que desde el ingreso a la maestría y hasta la culminación de este proceso han estado apoyando y hecho más fácil el camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma mater, si soy orgullosamente UNAM.

DEDICATORIA

***Si hay algo que he aprendido en la vida
y que no tiene precio es el contar con
una gran familia,
y en eso tengo mucha suerte,
para todos ustedes
esta tesis:***

Mamá gracias por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento de mi vida, por ser mi mamá.

Papá te agradezco el que nos hayas dado una educación, porque como bien dices es la mejor herencia que nos puedes dejar.

Hermanas (Irma, Leticia, Erika), Hermanos (Vicente, Israel, Miguel Angel) les agradezco su cariño, apoyo y consejos, porque sé que siempre puedo contar con ustedes en cualquier momento.

Saúl, Fernando, Monserrat y Angel mis queridos sobrinos, gracias por formar parte de mi vida.

Los quiero mucho

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado. Un esfuerzo total
es una victoria completa.*

Gandhi

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS PARTICULARES	7
ANTECEDENTES	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	47
LITERATURA CITADA	48
ANEXO	62

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
°C	Grados centígrados
CPS	Coproparascópico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<i>Ed</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>Eh</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Fuerza centrífuga relativa
min	minutos
mM	milimolar
M	molar
pb	pares de bases
Km	kilómetros
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pH	potencial de Hidrógeno
SDS	Dodecilsulfato de sódico
SRP	Proteína Rica en Serina (Serine Rich Protein)
STR	Repetidos en tándem (Short Tandem Repeats)
SSI	Solución salina isotónica
TBE	Tris-boratos-EDTA
U	Unidades enzimáticas
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar
IMC	Índice de Masa Corporal
DIC	Contraste Diferencial de Interferencia (Differential Interference Contrast)
π	Diversidad nucleotídica
θ	Polimorfismo nucleotídico
Ss	Sitios segregativos

RESUMEN

En México la amibiasis es una enfermedad endémica, y forma parte de las 20 causas más frecuentes de enfermedad en nuestro país, considerándose un problema de salud pública. Morelos es uno de los estados de México que muestran el mayor número de casos nuevos de amibiasis, en donde existe una alta prevalencia de la infección por *Entamoeba histolytica* y/o *Entamoeba dispar* en la población rural. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia y la dinámica de la infección por *E. histolytica* y/o *E. dispar* en una población escolar de Tlaltizapan, Morelos. Se estudiaron a niños escolares de 3 escuelas, en dicha población, el total de individuos estudiados fue de 309 estudiantes y sus familiares, a quienes se les determinó la presencia de parasitosis intestinal mediante análisis microscópico en muestras de heces frescas, obteniendo 72 muestras positivas para parásitos en general. La caracterización molecular se realizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando marcadores especie específicos altamente polimórficos de regiones intergénicas no codificantes asociadas a los RNA de transferencia, tanto en *E. histolytica* como de *E. dispar*. Los amplificados obtenidos fueron secuenciados y analizados para establecer los patrones de trasmisión de las especies de Entamoeba en los escolares y sus familiares cercanos. Se obtuvieron 8 distintos genotipos en los aislados obtenidos de la especie *E. dispar* con el marcador molecular NKD3-D5.

En ninguno de los casos en los que se identificó parasitosis intestinal se documentó el desarrollo de un proceso invasor. El genotipo 1 fue el más frecuente, el cual corresponde a la cepa de referencia *E. dispar* SAW760 considerada no patógena, siendo esto un impedimento para establecer la fuente de infección original ya que dicha especie se encuentra diseminada en toda el área estudiada.

ABSTRACT

In Mexico amoebiasis is endemic, and is part of the 20 most common causes of illness in our country, and remains a public health problem in Mexico. Morelos is one of the states in Mexico which has a largest number of new cases of amoebiasis, there is a high prevalence of infection with *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar* in rural population. The aim of this study was to determine the prevalence and dynamics of infection by *E. histolytica* and/or *E. dispar* in a school population of Tlaltizapan, Morelos. Schoolchildren were studied from 3 schools, from this population; the total number of individuals studied was 309 students and their families, in order to detect the presence of intestinal parasites a microscopic analysis was performed in fresh stool samples, obtaining 72 samples positive for parasites in general. Molecular characterization was carried out by PCR (Polymerase Chain reaction) in the positive samples, using species-specific primers for *E. histolytica* and *E. dispar* to amplified no-coding sequences of tRNA gene-linked short tandem repeat. The amplified fragments were sequenced and analyzed to establish the patterns of transmission of Entamoeba species in schoolchildren and their respective families. 8 different genotypes were obtained in *E. dispar* isolates with the molecular marker NKD3-D5.

In neither case in which intestinal parasites were identified developed an invasive process. Genotype 1 was the most frequent, which corresponds to the reference strain *E. dispar* SAW760 considered nonpathogenic. This finding didn't allow us to establish the source of the original infection, since this species is widespread throughout the study area.

INTRODUCCIÓN

En 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) aceptó la existencia de dos especies de amibas capaces de infectar al humano; las cuales son morfológicamente idénticas, una de ellas no patógena *E. dispar* y la otra *E. histolytica* potencialmente patógena, con capacidad para invadir el intestino humano, así como otros órganos extraintestinales [1], ambas especies difieren en características bioquímicas, inmunológicas y genéticas.

La OMS, define a la amibiasis como la infección ocasionada por *E. histolytica* y/o *E. dispar*, con o sin manifestaciones clínicas [1]. Aproximadamente sólo el 10% de los individuos infectados con *E. histolytica* desarrollan síntomas clínicos asociados con patología intestinal y/o extraintestinal [2].

La infección por *E. histolytica* tiene un amplio rango de modalidades clínicas en el huésped humano, las que van desde la infección luminal del intestino que cursa totalmente asintomática, hasta las formas de infección invasora intestinal y extraintestinal. Un gran número de personas colonizadas por *E. histolytica* o *E. dispar* eliminan espontáneamente la infección en períodos relativamente cortos (< 3 meses), algunos otros pueden ser portadores persistentes de la infección y permanecer infectados por largo tiempo excretando quistes en las heces hasta por 2 años [3].

En México la amibiasis es una enfermedad endémica. Datos obtenidos en una encuesta seroepidemiológica a nivel nacional señalan que alrededor del 8.41% de la población posee anticuerpos séricos anti-amibianos, lo cual se relaciona con el alto grado de exposición de la población mexicana a *E. histolytica* y/o *E. dispar* [4]. De hecho, la amibiasis forma parte de las 20 causas más frecuentes de enfermedad en nuestro país ocupando anualmente entre el 5º y el 7º sitio en dicha lista, considerándose un problema de salud pública. Los grupos etarios más frecuentemente afectados son los escolares menores de 15 años, con una franca elevación en los valores en niños entre los 5-14 años, donde factores de riesgos ambientales, socioeconómicos y demográficos incrementan la transmisión de la infección [5].

En los estados de la República Mexicana que muestran el mayor número de casos nuevos de amibiasis están: Chiapas, Estado de México, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Hidalgo, Tabasco, Yucatán y Morelos. En éste último, nuestro grupo ha realizado estudios multidisciplinarios encaminados a evaluar la prevalencia de infección por *E. histolytica* y/o *E. dispar* y la morbilidad debida a *E. histolytica* en población rural. Para ello se han utilizado herramientas moleculares para la caracterización de las especies de Entamoeba mencionadas, los resultados obtenidos de la evaluación de la prevalencia de infección en población rural del sur del estado de Morelos son: 11.4% de *E. histolytica*, 7.2% de individuos infectados por *E. dispar* y 2.4% para ambas especies [6].

Los estudios epidemiológicos realizados en áreas endémicas de nuestro país, utilizando marcadores genéticos especie específicos han demostrado que sólo el 10% de los individuos infectados por la especie *E. histolytica* desarrollan la enfermedad, ya sea intestinal o extraintestinal. *E. histolytica* es un parásito extraordinariamente complejo desde el punto de vista genético, ya que esta especie potencialmente patógena muestra diferencias en su capacidad de producir enfermedad, las cuales pudieran estar relacionadas con la variabilidad genética de la propia especie. Sabemos que tanto *E. histolytica* como *E. dispar* son especies muy polimórficas, tanto en regiones codificadoras del DNA como en regiones no codificadoras. Este polimorfismo se ha utilizado como herramienta para estudiar la epidemiología molecular de ambas especies en diferentes regiones endémicas del mundo, intentando relacionar los genotipos de este parásito con las formas clínicas de la amibiasis [7,8]; lo cual, aunque existen algunos datos sugerentes de dicha asociación aún no se encuentran marcadores polimórficos relacionados con la virulencia de las cepas de *E. histolytica*.

La diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, a través de la caracterización molecular en la última década del siglo XX, [9] obliga a re-evaluar la epidemiología de la amibiasis en términos de prevalencia y morbilidad de la infección en la población mundial, en particular en aquellas regiones geográficas con un alto nivel endémico.

Como se mencionó anteriormente, en el estado de Morelos existe una elevada frecuencia de infección por *E. histolytica* y *E. dispar* en población rural. Sin embargo, en

estudios previos no se ha encontrado una relación entre la frecuencia de infección y la morbilidad por amibiasis [10].

Un aspecto no abordado hasta el momento, es el análisis de la dinámica de la infección en la población escolar, específicamente se desconocen los mecanismos de transmisión de dichas especies de *Entamoeba* en la comunidad. Asimismo, se ha mencionado con anterioridad la posible existencia de transmisión intrafamiliar como uno de los factores más importantes en la frecuencia de infecciones parasitarias intestinales en los menores de 15 años, en donde las condiciones sociodemográficas, tanto familiares como a nivel escolar puedan estar involucradas en la transmisión de las infecciones parasitarias intestinales en particular de la infección por *E. histolytica* y/o *E. dispar*. Tratando de abordar estos puntos, el presente estudio pretendió establecer la dinámica de la infección por estas amibas, al caracterizar la especie infectante en una población escolar en el municipio de Tlaltizapan, en el estado de Morelos, utilizando biología molecular y herramientas de genética de poblaciones.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la dinámica de la infección por *E. histolytica* y *E. dispar* en una población escolar en el municipio de Tlaltizapan del estado de Morelos, y determinar los mecanismos de transmisión de ambas especies, a través de la identificación de los genotipos de los aislados obtenidos en los escolares, así como en sus familiares más cercanos (convivientes).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la prevalencia de infección por *E. histolytica* y *E. dispar* en la población escolar de Tlaltizapan, Morelos.
2. Identificar el patrón de infección, re-infección y morbilidad en la población estudiada.
3. Analizar el polimorfismo de las especies infectantes, tanto en los casos índice como en sus familiares más cercanos (convivientes).
4. Reconstrucción filogenética de las secuencias obtenidas de los productos de PCR para *E. histolytica* y *E. dispar*.

ANTECEDENTES

En 1925 Brumpt basado en evidencias clínicas y epidemiológicas propuso la existencia de 2 tipos de amiba, una de las cuales era patógena y la otra no, debido a que la infección podía cursar de manera asintomática en algunas personas y en otras el paciente cursaba con signos y síntomas característicos de la enfermedad, como podría ser la amibiasis intestinal y extraintestinal. Sin embargo, tal hecho fue rechazado por la comunidad científica de esa época [11]. Con el paso del tiempo y la obtención de información procedente de la investigación en torno a la amibiasis, en 1993 Clark y Diamond con base en evidencia bioquímica, inmunológica y genética, vuelven a postular que la hipótesis de Brumpt sobre la existencia de dos tipos de amibas morfológicamente indistinguibles era real y se trataba en realidad de especies distintas: *E. histolytica*, agente causal de la amibiasis (especie patógena) y *E. dispar*, parásito comensal del tubo digestivo (especie no patógena) [11]. Este hecho, permitió que la comunidad científica adoptará a *E. dispar* como una especie distinta, pero morfológicamente idéntica a *E. histolytica*, lo cual fue aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997 [1].

La amibiasis es una infección ocasionada por *E. histolytica* y/o *E. dispar* que no produce síntomas en el 90% de los individuos infectados [1]. La amibiasis es una de las infecciones parasitarias con una distribución cosmopolita presente en regiones tropicales y en países en vías de desarrollo como América Latina, África y Asia. A esta infección parasitaria se le considera la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial por infección parasitaria después de la malaria, tripanosomiasis y leishmaniosis, así como la tercera causa de morbilidad después de la malaria y tricomoniasis [12]. Los principales factores de riesgo para contraer esta infección varían de acuerdo a la zona geográfica que se trate. En países desarrollados esta infección se limita en gran medida a determinados grupos de la población, como son los inmigrantes que provienen de países en vías de desarrollo, individuos que han viajado a zonas endémicas, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, residentes de una institución psiquiátrica o individuos masculinos que tienen sexo con su mismo género.

En países en vías de desarrollo la infección es atribuida a diversos factores como son: los hábitos culturales, la edad, el hacinamiento, el estatus socioeconómico, los niveles de sanidad, así como las inadecuadas prácticas higiénicas de la población [13,14].

E. histolytica infecta al 10% de la población mundial y se estima que son 50 millones de personas que desarrollan amibiasis invasiva, lo que resulta entre 40,000 y 100,000 muertes debido a alguna complicación en la enfermedad. Sin embargo, el valor de la prevalencia en la amibiasis podría estar sobreestimada, ya que dichos valores son previos a la re-descripción de las dos especies (*E. histolytica* y *E. dispar*) [14,15].

El único huésped natural conocido de *E. histolytica* es el ser humano. *E. histolytica* 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. La cual, es una estructura circular alrededor de 10 a 16 micrómetros de diámetro, con cuatro núcleos visibles en la madurez del quiste. La viabilidad de los quistes en condiciones apropiadas de humedad puede durar varias semanas y estar disponibles para un nuevo huésped susceptible. Hay que subrayar que más del 90% de las infecciones tienen un curso asintomático y con frecuencia se auto-limita en diferentes períodos de tiempo [16,17]. El trofozoíto es la forma móvil del parásito con capacidad de colonizar y en algunos casos invadir la mucosa intestinal u otros órganos extraintestinales del huésped. El ciclo de vida y ambas formas del parásito se muestran en la Figura 1. La infección ocurre por ingerir agua y/o alimentos contaminados con quistes del parásito, que a su paso por el intestino se desinquistan y colonizan la mucosa intestinal del colon [18].

Ciclo de vida de *E. histolytica* y *E. dispar*

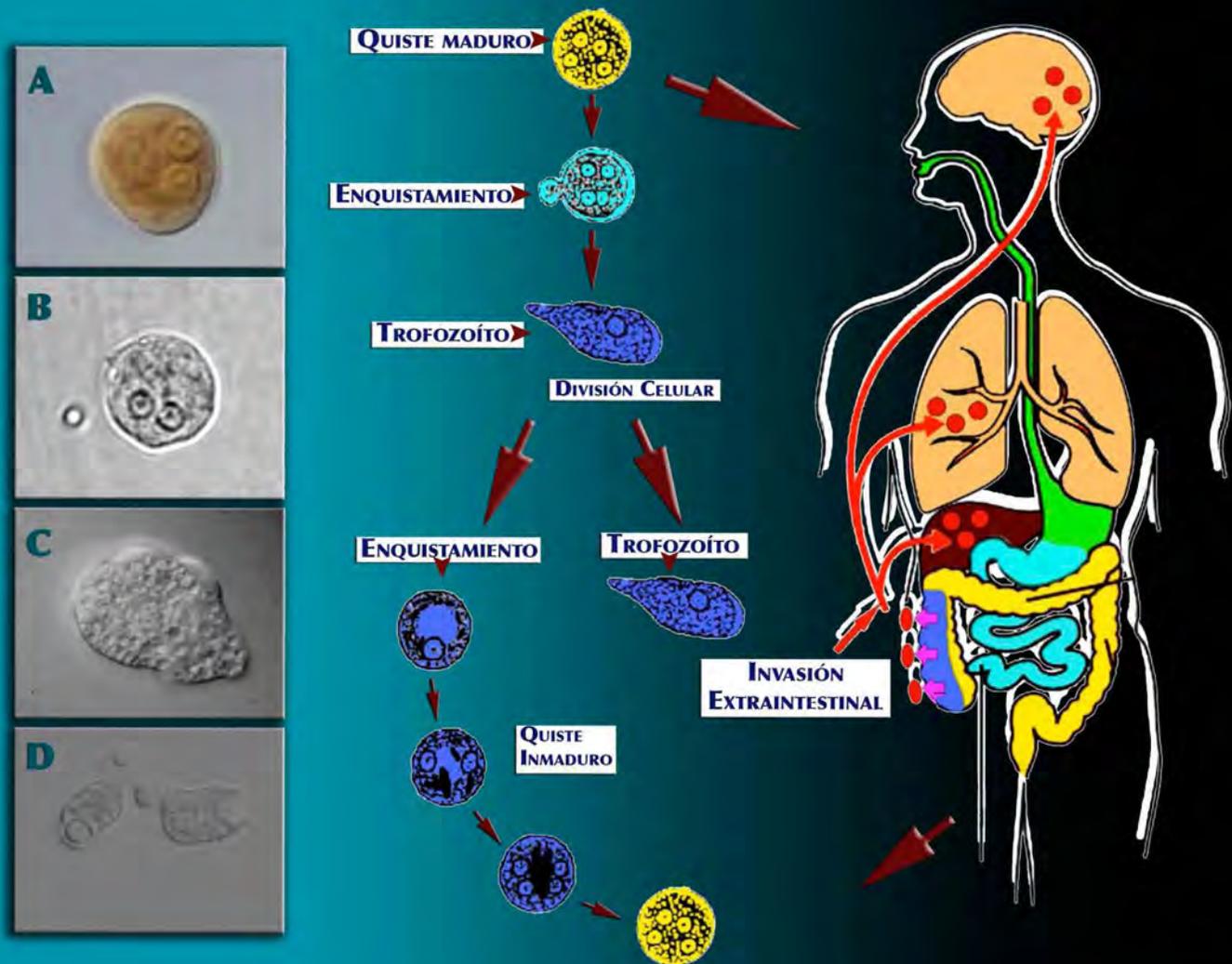


FIGURA 1.

A) Quiste maduro teñido con solución de lugol al 4% (100X).

B) Quiste maduro sin teñir (100X).

C) Trofozoíto observado con Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) (100X).

D) Trofozoíto de la especie *E. histolytica* con eritrocitos fagocitados (DIC 40X).

Ximenéz C y cols., 2011.

La amibiasis intestinal es básicamente una enfermedad aguda, donde el síntoma más frecuente es el dolor abdominal (cólicos) y la presencia de diarrea con moco y/o sangre, o un síndrome disentérico claro, sin embargo, la fiebre y otros síntomas sistémicos son poco frecuentes. Las formas graves de amibiasis invasiva se pueden observar en los niños pequeños (<5 años), mujeres embarazadas, personas mayores, en particular aquellos con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y en personas que están bajo tratamiento con fármacos inmuno-supresores o con trastornos de inmunodeficiencia. Las formas graves de la amibiasis son ameboma del colon, colitis necrotizante fulminante y megacolon-tóxico [15].

La amibiasis se sigue considerando como una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el humano a nivel mundial [12,19]. En México, de acuerdo a un estudio seroepidemiológico, se encontró que el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amibianos, lo que demuestra la alta frecuencia del parásito en nuestro medio [4].

Actualmente, se sabe que existen 2 tipos de amibas que morfológicamente son indistinguibles pero que por métodos bioquímicos, inmunológicos y genéticos se han clasificado como especies diferentes: *E. histolytica* y *E. dispar* [7,20]. Ambas especies son genéticamente diversas y de alta variabilidad para permitir el inicio de estudios de epidemiología molecular en diferentes áreas endémicas. Los nuevos datos sobre la epidemiología de la amibiasis basada en la tecnología de vanguardia sugieren que la variabilidad genética podría ser una herramienta importante en el estudio de la distribución geográfica de ambas especies y cepas específicas de Entamoeba, que pueden determinar las tasas de morbilidad de las distintas formas de infección amibiana en diferentes áreas geográficas. Algunas variantes genéticas de *E. histolytica* (cepas) se han aislado de portadores asintomáticos, pacientes con amibiasis intestinal invasiva o de muestras del material del absceso hepático amibiano [7,21,22]. Mientras que *E. dispar* se ha aislado principalmente en muestras de heces de portadores asintomáticos, también exhibe altos polimorfismos genéticos [7,23]. Recientemente hemos tenido algunas evidencias de variantes genéticas de *E. dispar*, que se han detectado en pacientes con amibiasis invasiva, al menos en dos países endémicos: Brasil y México. En Brasil, *E. dispar* (ICB-ADO cepa) se aisló de un paciente con colitis no disentérica, la cual se mantuvo en cultivo con su propia flora intestinal y mostró un comportamiento patógeno en modelos experimentales de absceso

hepático amibiano [24,25]; y en México, en las muestras del DNA extraído de material de drenado de absceso hepático de seis pacientes, donde claramente se observó la presencia de secuencias de DNA de *E. dispar* [26].

La búsqueda de herramientas moleculares para determinar la variación intraespecie de Entamoebas, se ha enfocado particularmente al estudio de genes polimórficos codificantes y secuencias de DNA no codificantes, que se caracterizan por poseer segmentos repetidos en tándem, los cuales han demostrado ser útiles en la identificación de variantes dentro de las especies *E. histolytica* y *E. dispar* [8,27]. Dentro de estos marcadores moleculares se encuentran los genes que codifican para la quitinasa [28], y la proteína rica en serina [29], o el gen específico de especie [30]. Por su parte Clark y colaboradores [31] encontraron que asociados a los genes que codifican para los RNA 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 alguna asociación 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, lo que desde el punto de vista epidemiológico podría servir para definir la prevalencia de cepas con capacidad invasora en diferentes zonas geográficas [32-34].

Posterior a la secuenciación del genoma de *E. histolytica*, uno de los descubrimientos más impactantes fue la abundancia y organización de los genes para tRNA, los cuales constituyen más del 10% del genoma de la amiba y casi todos se encuentran organizados en tándem con regiones intergénicas ricas en adenina y timina. Las regiones intergénicas de estos genes contienen estructuras complejas compuestas de pequeñas secuencias repetidas en tándem (STR, Short Tandem Repeats, por sus siglas en inglés) que varían en tamaño (7-12 pb), aunque algunos son de mayor tamaño (44 pb). Actualmente se está investigando la organización de estos genes en diversos aislados de *E. histolytica* [35].

En un estudio donde se utilizaron varios marcadores moleculares para genes de tRNA en muestras obtenidas de pacientes asintomáticos infectados con *E. histolytica*, diarrea/disentería y absceso hepático amibiano, se encontró que las diferencias en los genotipos se basan en la variación en los repetidos en tándem y que los genotipos que

predominan en estos 3 grupos de pacientes, fueron significativamente diferentes entre ellos, sugiriendo que el genotipo del parásito pudiera ser determinante en el desarrollo de la infección en el humano [14,33].

Actualmente no contamos con trabajos recientes que identifiquen y caractericen las variantes de *E. histolytica* y *E. dispar* que predominan en nuestro medio, o en nuestro país, para así poder compararlas con las que se han reportado en otras partes del mundo. Por lo cual, la finalidad de este trabajo es mostrar la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en la población escolar de Tlaltizapan estado de Morelos y la genotipificación de los aislados encontrados en la comunidad, utilizando marcadores especie específicos altamente polimórficos de las regiones intergénicas no codificantes asociadas a los RNA de transferencia, tanto en *E. histolytica* como de *E. dispar*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Transversal descriptivo para determinar la prevalencia de infección y cohorte descriptiva en la etapa de seguimiento.

Descripción de la población

El estudio se realizó en el municipio de Tlaltizapan localizado en el estado de Morelos (Figura 2). La población de estudio fue de escolares entre 5 y 14 años de edad. El tamaño de la muestra se calculó en 190 niños, se estimó a partir del número total de escolares (5,921) en la comunidad, para una proporción esperada de infección parasitaria intestinal de 15%, nivel de confianza del 95%, precisión de 5% y efecto de diseño de 1% (EpiInfo versión 6) [36]. Previa inclusión en el estudio, se les proporcionó información a los padres y menores acerca del estudio y sus características, así como los riesgos del muestreo, se obtuvo una carta de consentimiento informado de cada individuo en estudio. Dichos documentos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM. La permanencia en el estudio siempre fue voluntaria.



FIGURA 2. Municipio de Tlaltizapan en el estado de Morelos dentro de la República Mexicana.

Variables sociodemográficas

A todos los menores incluidos se les aplicó una encuesta con el fin de recabar las variables sociodemográficas de importancia para la parasitosis en general y sus antecedentes patológicos. El seguimiento de la población fue durante 12 meses. Las variables analizadas fueron las siguientes: presencia o no de fauna nociva, disposición de agua dentro de la casa, tipo de letrina, material de piso y consumo de agua potable o no potable. Se analizaron también el número de eventos diarreicos presentados durante los últimos 6 meses previos al estudio.

Índice de higiene en las escuelas

Las características de higiene en las tres escuelas incluidas en el estudio fueron analizadas a través de la asignación de un índice de higiene, el cual contempló las siguientes variables: instalaciones sanitarias, medio ambiente, condiciones de higiene de los edificios y áreas comunes, así como el compromiso de las autoridades de la escuela sobre la desinfección. Las escuelas quedaron clasificadas según su índice de higiene como bueno, regular y malo, para su posterior análisis en relación al estado de parasitado o no parasitado.

Índice de masa corporal

El peso corporal se expresó como la media de dos lecturas independientes, utilizando balanzas electrónicas (Medical Escala de Medida del Sistema Seca y Co., Hamburgo, Alemania). La estatura se midió con un estadiómetro portátil (Medical Sistema de Medición de Escala, Seca y Co), los valores se expresaron como la media de dos mediciones. El Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó con la siguiente fórmula: $\text{peso (kg)} / [\text{talla (m)}]^2$. El IMC se usó como un índice de peso relativo de las puntuaciones z de IMC para la edad y los percentiles se calcularon utilizando las tablas de crecimiento de acuerdo a la edad y el sexo del Centro para el Control y la Prevención de las enfermedades [37].

Índice de anemia

Al inicio del estudio, se determinó la concentración de hemoglobina (Hb). La muestra de sangre se examinó utilizando un analizador electrónico de HemoCue (HemoCue AB, portátil Analizador de Hb, Angelhom, Suecia). Los valores se capturaron en una base de datos para su posterior análisis, contrastando la Hb g/dl con las curvas de nivel de la concentración de Hb por grupos de edad [38].

Esquema de muestreo

En la primera etapa se realizó un muestreo de tamizaje para determinar la prevalencia de parasitosis intestinales en la población en estudio, a partir de la cual se calculó la correspondiente para *E. histolytica* y *E. dispar*. En una segunda etapa se llevó a cabo el seguimiento de la población utilizando para ello un esquema de muestreo polietápico con una periodicidad de cada 4 meses.

Muestras

Se solicitaron muestras de heces de 3 días consecutivos. La detección de parásitos intestinales se hizo mediante el análisis microscópico de heces frescas previamente teñidas con solución de lugol (4%), posteriormente los quistes se concentraron por la técnica de flotación en un gradiente de sulfato de zinc [39]. Brevemente, las muestras de heces se homogenizaron en solución salina isotónica (SSI) (NaCl 0.15M) y se filtraron a través de gasa para eliminar detritos. El filtrado se centrifugó a 600 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una solución de ZnSO₄ y se centrifugó nuevamente a 600 x g 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 DNA.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA, los quistes fueron transferidos a tubos Eppendorf de 2 ml, lavados con SSI y resuspendidos en 300 µl de solución de lisis (EDTA 100 mM pH 8, SDS 0.25%) [40]. Los tubos se sometieron a 5 ciclos de congelación y descongelación (etanol-hielo seco/baño maría a 37°C). Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron 1 hora 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 minutos a 65°C y posteriormente se hicieron extracciones con cloroformo, fenol-cloroformo y cloroformo. El DNA se precipitó con etanol y se resuspendió en 50 µl de H₂O. Finalmente, el DNA se pasó por una mini columna con Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los segmentos del DNA obtenido se amplificaron 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: DA-H5/H3 (Hsp 1-2), DA-D5/D3 (Dsp 1-2); NK-H5/H3, NK-D5/D3; S^{tg}aD-H5/H3, S^{tg}aD-D5/D3; y SQ5/SQ-H3, SQ-D5/SQ-D3 (Tabla 1 y 2). Todos ellos son marcadores moleculares especie específicos que amplifican secuencias altamente polimórficas de regiones intergénicas asociadas a genes que codifican para el RNA de transferencia, tanto en *E. histolytica* como de *E. dispar*, los cuales contienen estructuras complejas compuestas por pequeñas secuencias repetidas en tándem (STR). Con estos 8 pares de iniciadores (oligonucleótidos) 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 platinum Polymerase, Invitrogen) y 1 µl de cada iniciador a 20 µM. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C para la desnaturalización,

30 segundos para el alineamiento, la temperatura dependió del iniciador utilizado (Tabla 1 y 2) y 30 segundos a 72°C para extensión. Para la amplificación con los iniciadores se utilizó 1 µl de DNA de la muestra. En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 5 minutos a 94°C y al finalizar los 35 ciclos se dio otro ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se identificaron y analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz Ultra Violeta (UV), posteriormente se fotografiaron para tener su registro

Tabla 1. Iniciadores especie específicos para la caracterización molecular de *E. histolytica*

Iniciador	Gen	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
DA-H5 (Hsp 1) DA-H3 (Hsp 2)	tRNA	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATATGTT ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	340	50
NK2-H5 NK2-H3	tRNA	GAAGCGTCTTTTTTACTATTAGTG GGCGGTATTTTTAGAATAGGATAAG	≈ 600	58
S ^{TGA} D-H5 S ^{TGA} D-H3	tRNA	AAATCCTGCCACTGTCGTAA AATCCCCGTTGAAGAGTTCT	≈ 220	63
SQ5 SQ-H3	tRNA	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT GTGGGACCACTTTTTTATACCTA	≈ 360	55

En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 5 min a 94°C y al finalizar los 35 ciclos se dio otro ciclo de 10 min a 72°C.

Tabla 2. Iniciadores especie específicos para la caracterización molecular de *E. dispar*

Iniciador	Gen	Secuencia	Tamaño del amplificado (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
DA-D5 (Dsp1) DA-D3 (Dsp 2)	tRNA	TTGAAGAGTTCACTTTTTATATACTATA TAACAATAAAGGGGAGGG	430	50
NK-D5 NK-D3	tRNA	GCGGAAGCGTCTTTTTACTATTATTA GGGCGTATTTTTATATAATAAGAATAGGTGC	≈620	58
S ^{TGA} D-D5 S ^{TGA} D-D3	tRNA	AAATCCTGCCACTGTCGTAC AATCCCCGTTGAAGAGTTCA	≈240	63
SQ-D5 SQ-D3	tRNA	AGCATAGGTGTATAGGTGTTAGG GGTGGGACCATATTTTATACTTC	≈350	55

En todas las amplificaciones, los 35 ciclos siempre fueron precedidos por un ciclo de 5 min a 94°C y al finalizarlos 35 ciclos se dio otro ciclo de 10 min a 72°C.

Secuenciación y análisis filogenético

Los productos obtenidos en la PCR fueron enviados directamente para su secuenciación a la Unidad de secuenciación de la Universidad de Washington en Seattle, se envió el producto de PCR en un volumen de 10 µl. La secuenciación se realizó en un secuenciador capilar (ABI-100 Avant).

Las secuencias fueron verificadas manualmente con el programa BioEdit [41]. La identidad taxonómica se estableció comparando las secuencias obtenidas contra las disponibles en el GenBank (NCBI). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de software CLUSTAL X [42].

Posteriormente se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS), versión 17, utilizando el método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

Diversidad genética

Con las secuencias de NKD3-D5 obtenidas de los escolares, familiares y las reportadas en el GenBank se realizó un análisis de diversidad genética, utilizando el programa DnaSP versión 5.0 [43] y se obtuvieron el número de sitios segregativos, el número de haplotipos, la media de la diversidad nucleotídica por sitio (π) y la variación esperada por sitio asumiendo una evolución neutral (θ).

RESULTADOS

Descripción de la población

De los 309 participantes, 156 pertenecen al sexo masculino y 153 al femenino. Las edades de los participantes oscilaron entre 5 a 14 años. En la Tabla 3, se muestra la distribución de los niños por edad y sexo en cada una de las tres escuelas estudiadas, la distribución de ambos sexos fue proporcional en la población de estudio. Las variables sociodemográficas en el entorno familiar investigadas como posibles factores de riesgo para la presentación de enfermedades parasitarias se muestran en la Tabla 4, la diferencia entre el grupo de los niños parasitados y no parasitados no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). El consumo de agua potable y no potable también fue considerado dentro los factores de riesgo, sin embargo no se incluyó en la Tabla 4 dado que ambos grupos parasitados y no parasitados bebían agua potable. En las escuelas se estableció un índice de higiene, el cual, se basó en las características sanitarias de las instalaciones (facilidades sanitarias, baños limpios, la disponibilidad de botes de basura, limpieza de aéreas comunes, el hacinamiento y el acceso a las autoridades sanitarias). Los resultados del análisis de asociación entre el índice de higiene y la frecuencia de parasitosis en los niños de las escuelas estudiadas, se presentan en la Tabla 5. El análisis mostró que las diferencias entre las escuelas no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.74$). Eventos diarreicos presentados entre los parasitados y no parasitados fueron de 40/72 y 107/238 respectivamente, con ninguna diferencia significativa entre ambos grupos. Es importante mencionar que durante todo el estudio, ninguno de los niños parasitados o cualquier miembro de la familia desarrolló un evento invasor por *E. histolytica*.

Tabla 3. Distribución de los niños por edad y sexo

Escuela	Rango de edades (años)	Número de niños		Total
		Masculino	Femenino	
Emiliano Zapata ⁽¹⁾	5–9	39	38	77
	10–14	26	36	62
	Subtotal	65	74	139
Lázaro Cárdenas ⁽²⁾	5–9	19	6	25
	10–14	10	10	20
	Subtotal	29	16	45
Sofía Vázquez ⁽³⁾	5–9	33	35	68
	10–14	29	28	57
	Subtotal	62	63	125
Total		156	153	309

⁽¹⁾Prueba χ^2 de Pearson = 1.05 $p= 0.31$

⁽²⁾Prueba exacta de Fisher $p= 0.12$

⁽³⁾Prueba χ^2 de Pearson = 0.07 $p= 0.79$

Tabla 4. Asociación de las variables sociodemográficas en el entorno familiar y la condición de parasitados

Variables		Niños parasitados		<i>p</i>	OR	IC 95%
		Positivo	Negativo			
Fauna nociva	Si	65	218	0.73	1.63	(0.35-7.58)
	No	2	11			
Disposición de agua dentro de la casa	Si	65	224	0.27	0.53	(0.20-1.40)
	No	7	13			
Tipo de letrina	Letrina	67	214	0.26	2.66	(0.59-11.8)
	Tanque séptico	2	17			
Material del piso	Cemento	58	210	0.12	0.52	(0.24-1.16)
	Tierra	11	21			

*Prueba exacta de Fisher

Tabla 5. Niños parasitados y no parasitados por escuela

Escuela	Examen microscópico de muestras de heces			OR	IC 95%
	Positivo (%)	Negativo (%)	Total		
SofíaVázquez ⁽⁺⁺⁺⁾	29 (23.2)	96 (76.8)	125	1	--
Lázaro Cárdenas ⁽⁺⁺⁾	13 (28.9)	32 (71.1)	45	1.34	(0.58-3.09)
Emiliano Zapata ⁽⁺⁾	30 (21.6)	109 (78.4)	139	0.91	(0.49-1.69)
Total	72	237	309		

⁽⁺⁺⁺⁾ Índice de higiene = bueno

⁽⁺⁺⁾ Índice de higiene = regular

⁽⁺⁾ Índice de higiene = malo

Chi-cuadrada con tendencia lineal = 0.11 $p= 0.74$

Características antropométricas de la población en estudio

El cálculo de índice de masa corporal (IMC) por sexo y edad entre los 309 niños estudiados indicaron diferencias en la población por sexo y edad. Más del 50% (192) de los niños tenían entre el 5^o y el percentil 85, que corresponde al índice de masa corporal normal. Sin embargo, 13 niños (4.2%) estaban bajo el percentil 5 que se considera con bajo peso, 57 niños (18.6%) tenían un IMC en el percentil 85 al 95, que se define como sobrepeso y 44 (14.3%) niños fueron clasificados como obesos (por arriba del percentil 95). Cuando el índice de masa corporal se correlaciona con la infección parasitaria intestinal mostrado en la Tabla 6, las diferencias detectadas no fueron estadísticamente significativas ($p= 0.41$).

Tabla 6. Características antropométricas. Asociación de índice de masa corporal y estado de parasitosis

Examen	<5	5 a 85	85 a 95	≥ 95	Total
Microscópico (n=306)	percentil (bajo-peso)	percentil (peso normal)	percentil (sobre-peso)	percentil (obesidad)	(%)
Parasitado	3	51	10	8	72 (23.5)
No-parasitado	10	141	47	36	234(76.4)

Prueba de Chi cuadrada=2.85, $p= 0.41$

Índice de anemia

En la Tabla 7, se presenta la concentración de hemoglobina en muestras de sangre periférica (Hb g/dl) en 299 de los 309 niños incluidos en el estudio. Los valores se compararon con los datos de referencia por edades para los criterios de diagnóstico para anemia reportados por Lanzkowski en 2011. En el grupo de estudio (n = 299) encontramos 21 (6.9%) niños con valores de Hb g/dl que correspondía a un diagnóstico de anemia para su edad. Sin embargo, las diferencias en los niveles de Hb g/dl entre los grupos de niños parasitados y no parasitados no fueron estadísticamente significativas ($p= 0.79$).

Tabla 7. Asociación de hemoglobina y la infección parasitaria intestinal

Niveles	El examen microscópico de muestras de heces			
	Positivo (n=67)		Negativo (n=232)	
		%		%
Hb*	5	7.46	16	6.89
Hb**	62	92.5	216	93.1

*Niños con niveles de hemoglobina asociado a anemia (Lanzkowski, 2011)

**Niños con niveles normales de hemoglobina

Prueba exacta de Fisher $p= 0.79$

Prevalencia de parasitosis

De todos los participantes en el estudio se recolectaron muestras de heces de 3 días consecutivos para la primera fase del estudio (tamizaje) para determinar la prevalencia de parasitosis intestinal en la población escolar. Los resultados del análisis microscópico mostró que 72 muestras fueron positivas para parasitosis en general, es decir, la prevalencia de parasitosis en la población fue del 23.3%, del cual el 15.2% presentó parasitosis únicas y el 8.09% parasitosis múltiple por dos o más parásitos. Los parásitos encontrados fueron: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Blastocystis spp.*, *Giardia lamblia*, el complejo *E. histolytica/E. dispar*, *Iodamoeba butschlii*, *Hymenolepis nana* y *Chilomastix mesnili*. Los parásitos que mostraron la mayor frecuencia fueron *Entamoeba coli* (37.5%), *Endolimax nana* (26.38%), *Blastocystis spp.* (26.38%), *Giardia lamblia* (22.22%) y el complejo *E. histolytica/E. dispar* (15.27%).

Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* por PCR

Posterior a la realización de la fase de tamizaje, las muestras fueron tratadas para la extracción del DNA de los quistes, protocolo previamente descrito en la sección de materiales y métodos. Teniendo el DNA se inició la detección de la especie infectante utilizando la PCR. De las 72 muestras pertenecientes a los escolares clasificados como positivos para parasitosis por análisis microscópico encontramos que por PCR se obtuvieron 30 amplificados de *E. histolytica* y/o *E. dispar*, utilizando iniciadores especie-específicos para la caracterización molecular de la Entamoeba infectante lo que representó el 41.7% de prevalencia del complejo *E. histolytica* y/o *E. dispar* del total de las 72 muestras parasitadas. Se identificaron 8 muestras como portadoras de *E. histolytica*, 19 portadoras de *E. dispar* y 3 portadoras con infección mixta. Con el fin de establecer la dinámica de la infección por *E. histolytica* y/o *E. dispar*, los familiares de los escolares también fueron muestreados y el DNA se extrajo de las muestras de heces y se procedió a la PCR para la identificación de la Entamoeba infectante.

Secuenciación

Los amplificadores obtenidos se enviaron a secuenciar, obteniendo 19 secuencias con el marcador molecular NKD3-D5, para *E. dispar*, provenientes de escolares y sus familiares. Las secuencias fueron analizadas, alineadas manualmente [41] y comparadas con secuencias ya reportadas en la literatura [44], así como con las obtenidas en los diferentes individuos incluidos en el estudio.

Análisis de secuencias con base al número de motivos

Con el objetivo de establecer la dinámica de la infección por *E. dispar* se analizaron las secuencias de los niños en edad escolar y sus familias, incluyendo las secuencias previamente reportadas en el GenBank con el marcador molecular NKD3-D5. El análisis de los aislados con este marcador molecular se basó en la diversidad y número de motivos encontrados en las secuencias. Se definieron 24 motivos diferentes. Cada motivo fue representado con un cuadro y un color específico. En el caso de algunos de los motivos consistieron en dos o cuatro secuencias que se decidieron englobar en un solo motivo dado a que la diferencia entre ellos fue la sustitución de tan solo un nucleótido. Esto permitió la definición de los patrones genéticos, tomando el número de motivos repetitivos para establecer una correlación entre escolares y sus familias. Figura 3.

TLALTIZAPAN

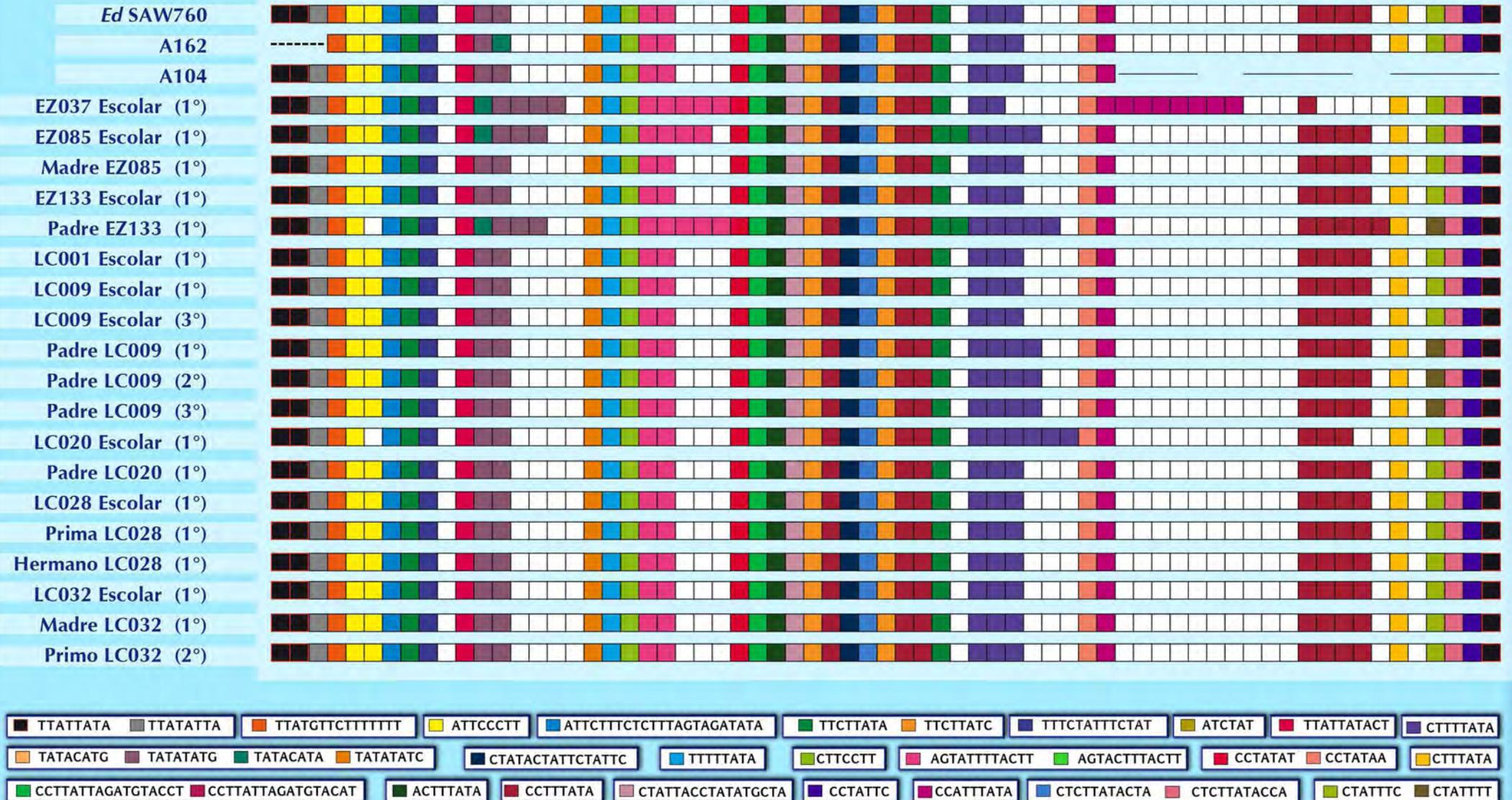


FIGURA 3. Representación esquemática de los motivos encontrados en los aislados de escolares, familiares y secuencias reportadas en el GenBank con el marcador molecular NKD3-D5 para *E. dispar*.

Genotipos

En relación a los genotipos encontrados en los niños parasitados y sus familiares, se encontraron 8 genotipos, cada uno representado por un color (Figura 4). Además, se observó que la mayoría de los niños de la escuela Lázaro Cárdenas tenían el genotipo 1, el mismo que compartieron con algunos de sus familiares más cercanos, a excepción del escolar LC020 que presentó el genotipo 8, diferente al de sus compañeros. Se presentaron casos de infección persistente, como en el caso del escolar LC009 y de su padre quien se mantuvo infectado por la misma Entamoeba (genotipo 7), durante todo el seguimiento, diferente al de su hijo en quien se identificó al genotipo 1. Este fenómeno no lo encontramos en la escuela Emiliano Zapata, en esta comunidad no se identificó ningún genotipo que se compartiera entre los escolares y sus familiares, sin embargo, sí se identificó al genotipo 1.

El genotipo 1 fue el de mayor frecuencia en secuencias de escolares y familiares, y corresponde al mismo genotipo de la cepa de referencia *E. dispar* SAW760.

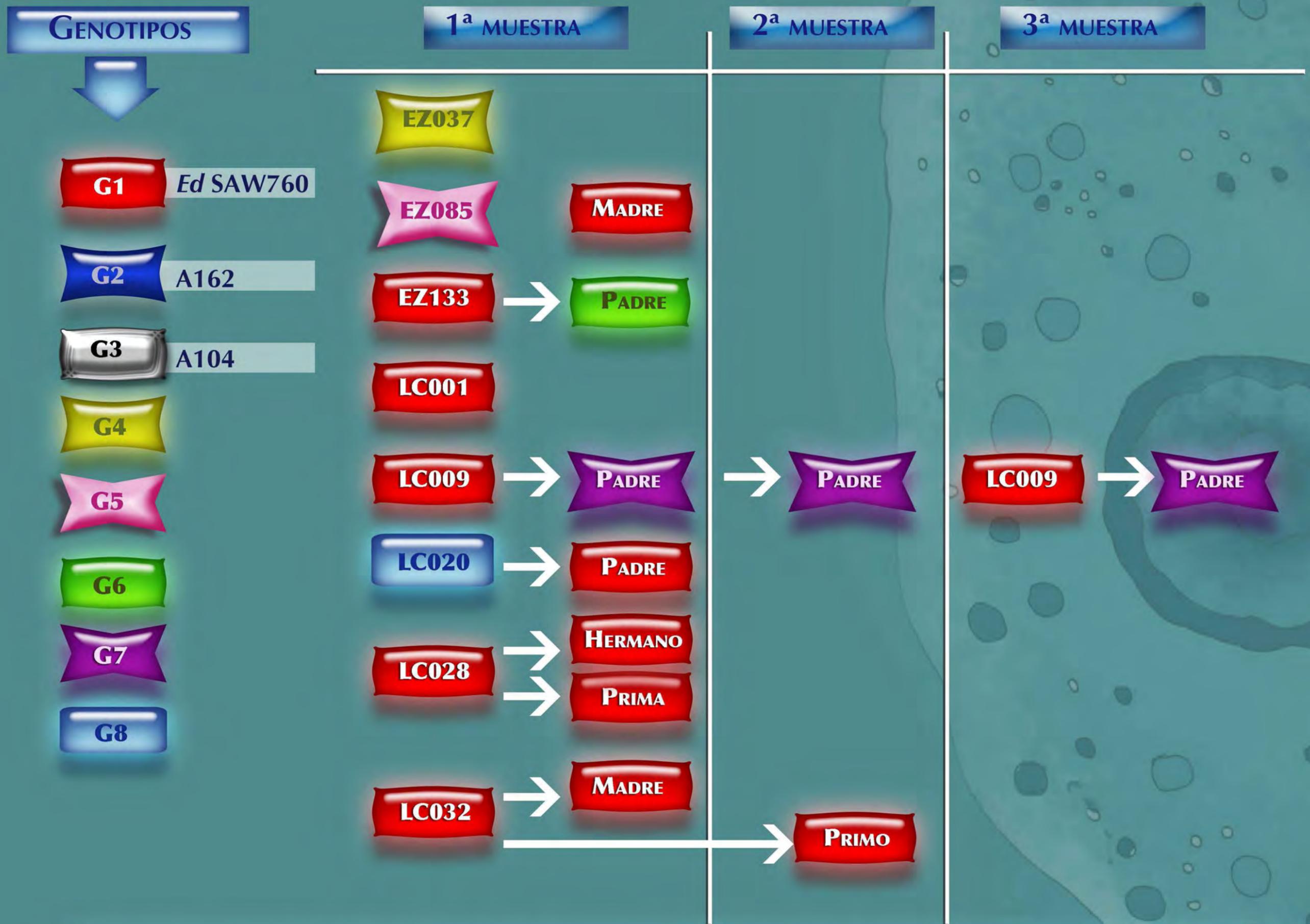


FIGURA 4. Representación de la relación de los genotipos encontrados en los escolares y sus familiares cercanos, en sus diferentes muestreos.

Diversidad genética

La diversidad genética de *E. dispar* analizada utilizando el marcador molecular NKD3-D5 se muestra en la Tabla 8, en donde se puede observar que el grupo que incluye las 19 secuencias obtenidas de escolares y sus familiares, se obtuvieron 6 haplotipos considerando inserciones, deleciones y sustituciones, 8 sitios segregativos y valores de π de 0.00337 y para θ de 0.00622. Y al realizar el análisis con todas las secuencias incluyendo las disponibles en el GenBank se obtuvieron 8 haplotipos igualmente considerando inserciones, deleciones y sustituciones a partir de 22 secuencias, con un total de 9 sitios segregativos y valores de π y θ de 0.00147 y 0.00354 respectivamente.

Tabla 8. Parámetros relacionados con la diversidad genética de secuencias de la especie *E. dispar*, utilizando el marcador molecular NKD3-5 (603pb)

Grupos ¹	No. de Secuencias	No. de Haplotipos	Ss ²	π	θ
Esc y Fam <i>E. dispar</i>	19	6	8	0.00337	0.00622
<i>E. dispar</i> total	22	8	9	0.00114	0.00185

¹Esc y Fam *E. dispar*: Número de muestras de escolares y familiares obtenidas de Tlaltizapan; *E. dispar* total: Número total de secuencias analizadas incluyendo las de Tlaltizapan y las disponibles en el GenBank

²Número de sitios segregativos

Reconstrucción filogenética

Se creó una matriz en donde se codificaron el número de motivos que se observaron en los aislados obtenidos como presentes o ausente asignándole un valor numérico: 1= presente y 0= ausente. Posteriormente se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS), versión 17, por el método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). La reconstrucción filogenética mostro una divergencia en dos principales grupos: A y B, donde podemos resaltar que la mayoría de las secuencias de escolares y sus familiares pertenecen al grupo A. Este grupo presentó varios subgrupos y en el subgrupo I se encuentran las secuencias de los escolares de la escuela Lázaro Cárdenas y algunos de sus familiares, los cuales están compartiendo el mismo subgrupo con la cepa de referencia *E. dispar* SAW760, que corresponden al genotipo 1. El resto de los genotipos se distribuyeron en otros subgrupos (Figura 5).

Reconstrucción filogenética con el marcador molecular NKD3-D5 para *E. dispar*

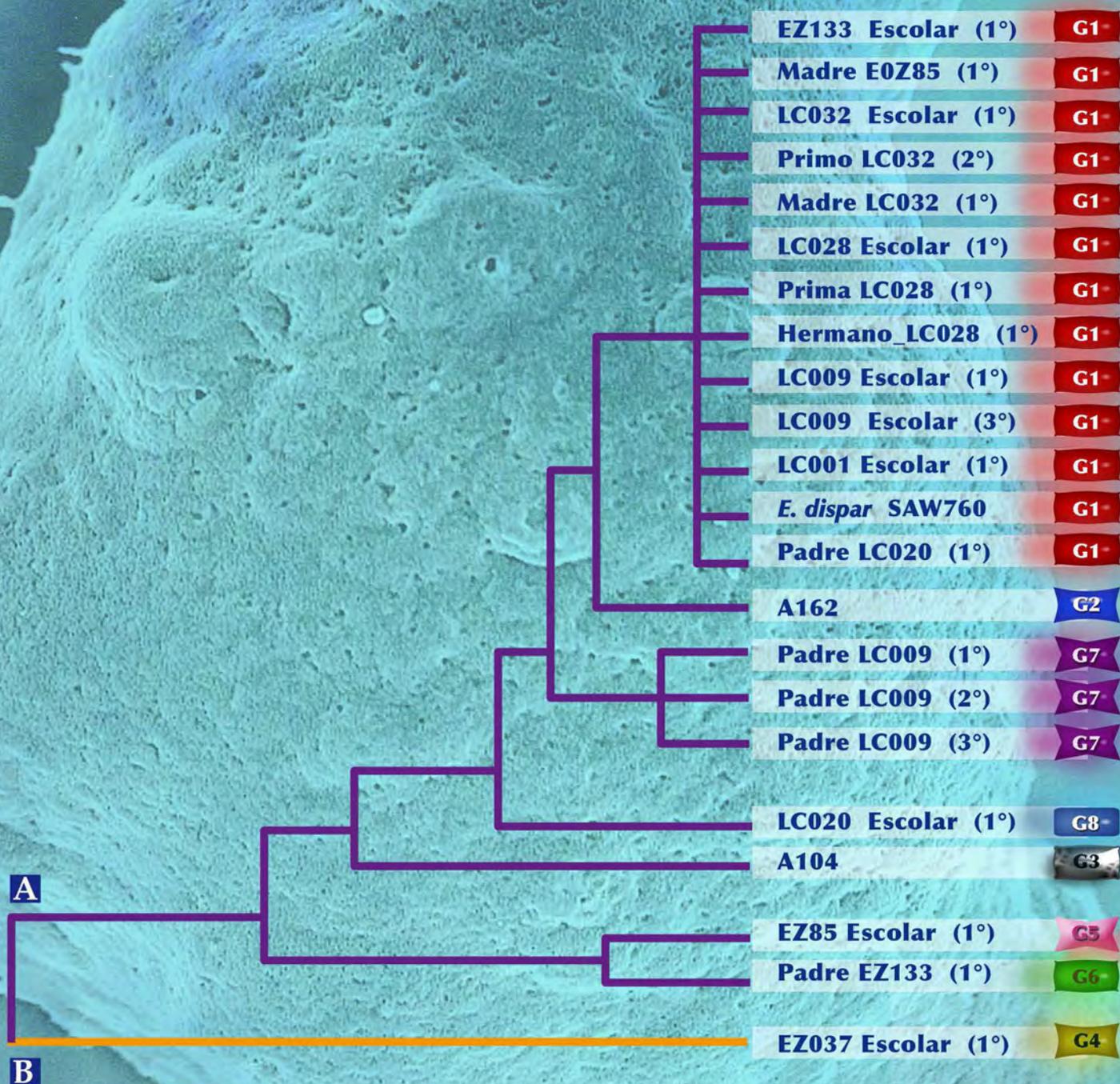


FIGURA 5. Representación filogenética de los aislados obtenidos en los escolares, familiares y secuencias reportadas en el GenBank.

DISCUSIÓN

Los parásitos intestinales pasan parte de su ciclo de vida en el tracto digestivo de los humanos, en donde se multiplican y se adaptan expresando sus factores de patogenicidad [45]. Aunque la fase comensal de la mayoría de los parásitos suele ser tolerada y cursar como una infección asintomática, infecciones activas especialmente por múltiples parásitos pueden causar problemas de salud y deficiencia del desarrollo en edad escolar. La re-infección es una de las principales preocupaciones en áreas endémicas con precarias condiciones socioeconómicas, donde una gran proporción de personas continúan re-infectándose en un tiempo relativamente corto [46].

Las infecciones parasitarias intestinales se encuentran entre las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo y son más prevalentes y persistentes en los niños, en especial en aquellos en edad escolar representando un grupo de riesgo para infecciones parasitarias.

Las infecciones intestinales son endémicas en países en vías de desarrollo y constituyen un problema de salud pública, en donde el ambiente así como los factores socioeconómicos y demográficos incrementan el riesgo de transmisión [47].

En países en vías de desarrollo, como es el caso de México, las infecciones parasitarias son atribuidas a diversos factores de riesgo, entre los que se pueden citar los malos hábitos higiénicos, el consumo de alimentos en sitios insalubres, el fecalismo, el consumo de agua no potable, el hacinamiento, la presencia de diarrea en alguno de los miembros de la familia, y la proximidad con un portador aunque este sea asintomático [48, 49], factores que contribuyen a la persistencia y diseminación de las parasitosis. Sin embargo, en todas las variables sociodemográficas investigadas, en el presente estudio, entre los niños parasitados y no parasitados (Tabla 4) las diferencias no fueron estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Los resultados sugieren que las fuentes de infección en estos grupos de niños pueden estar fuera del entorno familiar. Otro sitio donde los niños pasan una buena parte de su tiempo es en la escuela. Algunas de las escuelas son de

tiempo completo, donde los niños desayunan y comen, y por ello estas serían una fuente de infección alternativa. A pesar que la OMS ha recomendado tres estrategias de control para prevenir las infecciones parasitarias: 1) tratamiento de desparasitación periódica; 2) mejores servicios de saneamiento y abastecimiento de agua potable y 3) educación para la salud [50]. Se ha reportado que en ocasiones las condiciones sanitarias de las mismas escuelas han contribuido al aumento en la prevalencia de las infecciones parasitarias en los escolares [51,52] asociadas a pobres condiciones sanitarias, suministro insuficiente de agua, baños no aseados y falta de jabón, así como áreas comunes sucias. En contraste, nuestros resultados con base en las condiciones de higiene de cada una de las tres escuelas incluidas en el estudio, que de hecho presentaban características diferentes, sobre todo en las instalaciones sanitarias, el medio ambiente, las condiciones de higiene de los edificios y áreas comunes, así como en el compromiso de las autoridades de las escuelas para ofrecer un entorno higiénico (variables consideradas en el cálculo del índice de higiene) en cada escuela, clasificándolas como: ⁽⁺⁺⁺⁾bueno, ⁽⁺⁺⁾regular y ⁽⁺⁾malo (Tabla 5), no encontramos que tales diferencias entre escuelas fueran estadísticamente significativas ($p= 0.74$). En resumen, las variables demográficas en los ambientes de la familia y la escuela de los niños estudiados no son las determinantes de la infección parasitaria intestinal (Tablas 4 y 5), lo cual sugiere la existencia de una amplia gama de fuentes de propagación de parásitos intestinales en el medio ambiente, la susceptibilidad del huésped a la infección, y/o la virulencia de la especie infectante.

Los parásitos intestinales son agentes etiológicos del síndrome de diarrea en niños y adultos, sin embargo, los niños menores de 15 años son el grupo de mayor riesgo y son ellos en los que los repetidos ataques de diarrea tienen efectos negativos en el desarrollo, el estado nutricional y habilidades cognitivas [53]. Al analizar los antecedentes patológicos relacionados específicamente con los episodios de diarrea en los 12 meses anteriores al estudio y la presencia de moco o sangre en las heces en los niños parasitados y no parasitados, se encontró que en el grupo de niños parasitados se presentaron 107 episodios de diarrea en comparación con 40 episodios en el grupo de niños no parasitados, sin embargo, la diferencia entre los grupos no fue estadísticamente significativa ($p= 0.11$). Con respecto a la diarrea con sangre y moco, sólo había ocho de estos episodios en los niños parasitados y la diferencia entre los grupos tampoco fue significativa ($p= 0.23$). Referente a

las características antropométricas de la población de estudio, se observaron diferencias en la población por sexo y edad, el índice de masa corporal entre los 309 niños estudiados indicaron que más del 50% (192) de los niños tenían un IMC normal (entre el percentil 5 al 85); 13 niños (4.2%) presentaron bajo peso (bajo el percentil 5); 57 niños (18.6%) tenían sobrepeso (percentil 85 al 95), y 44 niños (14.3%) con un IMC que los clasifico como obesos (por encima del percentil 95). No se presentó una diferencia significativa ($p= 0.41$), entre la condición de parasitado y no parasitado y el IMC en cada uno de los escolares estudiados [Tabla 6]. En relación a la presencia de anemia, 21 niños (6.9%) tuvieron valores de hemoglobina que fueron de diagnóstico de anemia para su edad. Valores que se compararon con los datos de referencia por edades para los criterios de diagnóstico de anemia reportados por Lanzkowski en 2011. Sin embargo, las diferencias en los niveles de hemoglobina entre los niños parasitados y no parasitados no fueron estadísticamente significativas ($p= 0.53$) [Tabla 7]. Al parecer en los niños estudiados, el parasitismo no afectó su crecimiento y desarrollo, ni la predisposición a presentar anemia, contrastando con estudios en donde la presencia de parasitismo si ha tenido efectos perjudiciales sobre el crecimiento y desarrollo de los niños, así como presencia de anemia por deficiencia de hierro, principalmente en los niños con eventos repetitivos de diarrea [54-56].

Una de las estrategias recomendadas por la OMS, es el tratamiento de desparasitación periódica, programa dirigido básicamente a la población escolar, lo que ha provocado un cambio en la morbilidad de las infecciones intestinales parasitarias particularmente en el control de helmintos. Por otro lado, es evidente que esta intervención no disminuye la frecuencia de infección intestinal por protozoarios, información basada en los datos oficiales de las tasas de incidencia de la infección por protozoos en los últimos 5 años [57].

De acuerdo a los resultados obtenidos en relación a la prevalencia de parasitosis en la población de Tlaltizapan encontramos que el 23.3% se encontraba parasitada, de éstos el 15.2% presentó parasitosis únicas y el 8.09% parasitosis por dos o más parásitos. Los parásitos que presentaron la mayor frecuencia y que se consideran patógenos para el humano fueron: *Blastocystis spp.* 26.3%, *Giardia lamblia* 22.2% y el complejo *E. histolytica/E. dispar* 15.2%. Estos resultados pueden ser comparados con los que se

obtuvieron en el 2005 en una comunidad rural ubicada a 100 km al sureste de Tlaltizapan [7]. En ambos casos, hubo una clara ausencia de infecciones por helmintos y presencia de protozoarios patógenos como *E. histolytica*/*E. dispar* y *G. lamblia*. En el presente estudio la frecuencia de la infección por *Blastocystis* fue notablemente alta (26.3%), lo que contrasta con la ausencia completa de la infección por *Blastocystis* en el estudio anterior [7], pero concuerda con la reportada en Tailandia, Filipinas y Brasil, en donde la prevalencia de este microorganismo fue del 20% al 40%, encontrando que los niños de 5 a 10 años de edad tuvieron la prevalencia más alta de la infección [58-60]. Otro grupo considerado en riesgo y que es afectado por *Blastocystis* son pacientes inmunocomprometidos en los cuales puede ser considerado como un parásito oportunista [61-63].

Blastocystis spp. es un parásito protozooario inusual entérico de los seres humanos y de algunos animales [64,65]. El parásito fue descrito por primera vez en el año 1900 [66,67], pero sólo en la última década se han realizado avances en el conocimiento de su biología. El examen microscópico de muestras fecales frescas, es el método diagnóstico de rutina para su detección, pero su similitud con otros pequeños protozoarios intestinales y la variación en su morfología pueden llevar a un diagnóstico erróneo y por consiguiente a una subestimación de la prevalencia de éste parásito [59]. Esto ha dificultado entender su modo de reproducción, ciclo de vida, prevalencia y patogénesis, por lo que en la actualidad su carácter patogénico es controvertido. Sin embargo, *Blastocystis* puede causar diarrea en niños de edad preescolar y escolar, con pobres hábitos higiénicos [68,69]. En el presente estudio, los sujetos fueron interrogados específicamente con respecto a la presencia de síntomas intestinales asociados a parasitosis, y cabe señalar que tanto los niños parasitados y no parasitados fueron asintomáticos en el momento del estudio. Al parecer como otros protozoarios intestinales [6,26,69-71] la patogenicidad depende del gran polimorfismo existente en las diversas especies de *Blastocystis*, ya que los seres humanos pueden ser infectados por numerosos genotipos zoonóticos [72-74].

Por otra parte, la prevalencia de parásitos patógenos, considerados como los principales protozoarios causantes de la diarrea, particularmente en niños, encontramos a *Giardia lamblia* y el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*. La giardiasis causada por *Giardia lamblia*, afecta predominante a los niños, quienes por lo general son asintomáticos y en

casos crónicos es una causa frecuente de diarrea, que puede tener un impacto negativo en su crecimiento y desarrollo, al causar mala absorción con pérdida considerable de peso y llevar a la desnutrición [75]. La prevalencia de *G. lamblia* en la población fue de 22.2%, indicando una alta prevalencia del mismo en la población, siendo el segundo parásito más frecuentemente encontrado en nuestro estudio, en contraste con lo encontrado en otros estudios en donde se ha reportado una prevalencia que varía del 13.9% al 10.8% [76]. *Giardia lamblia* es uno de los principales parásitos en la etiología de la diarrea crónica y persistente [78,79], y como consecuencia se presenta la mala absorción que afecta seriamente el estado nutricional y desarrollo particularmente en los niños, en diversos estudios esta asociación ha sido demostrada [56,75,80], sin embargo, aunque en nuestros niños la prevalencia de infección por *G. lamblia* fue alta, no hubo una relación en la alteración del desarrollo en los niños. Razón que pudiera ser explicada por el hecho de que *G. lamblia* es un parásito complejo, y de acuerdo a los estudios realizados en relación a sus genotipos y su patogénesis [81-84], encontramos una división en dos grupos: genotipo A (o polaco) y genotipo B (o belga) [85]. Además de sus diferencias genéticas, ambos genotipos pueden tener un número importante de diferencias biológicas, por ejemplo, el genotipo B fue significativamente más patógeno que el genotipo A [86]. En el 2001 Homan y Mank [87] reportaron una fuerte correlación entre el genotipo y el tipo de diarrea, encontrando una asociación del genotipo A con la diarrea leve e intermitente y para la diarrea grave y persistente con el genotipo B. Sin embargo, Eligio-García y colaboradores [88] y Lalle y colaboradores [89] no encontraron ninguna correlación entre los síntomas y el genotipo. Al tomar en cuenta la información anterior podemos decir que la variabilidad genética en *Giardia lamblia* influye significativamente en su epidemiología, en la susceptibilidad del huésped para presentar un estado de portador asintomático o sintomático.

El tercer parásito con mayor frecuencia encontrado fue el complejo *E. histolytica/E. dispar*. En México la amibiasis ocupa el octavo lugar dentro de las 20 primeras causas de enfermedad y sigue siendo un problema de salud pública en nuestro país. La amibiasis se define como la infección ocasionada por *E. histolytica* y/o *E. dispar* con o sin manifestaciones clínicas [1]. La infección por *E. histolytica* tiene un amplio rango de modalidades clínicas en el huésped humano, las que van de la infección luminal del intestino que cursa totalmente asintomática, hasta las formas de infección invasoras intestinal y extraintestinal. Un gran

número de personas colonizadas por *E. histolytica* o *E. dispar* eliminan espontáneamente la infección en períodos relativamente cortos (< 3 meses) [3,90] algunos otros pueden ser portadores persistentes de la infección y permanecer infectados por largo tiempo excretando quistes en las heces hasta por 2 años, como es el caso de los llamados portadores asintomáticos de *E. histolytica* [3,90].

Durante décadas se pensó que *E. histolytica* era un organismo que podría producir o no la enfermedad. No fue hasta los 90s cuando las técnicas en biología molecular permitieron la diferenciación genética de *E. histolytica* patógena y no patógena en dos especies diferentes, una *E. histolytica* con capacidad invasora y la otra *E. dispar*, la cual puede infectar sin causar daño tisular. Finalmente en 1997 la OMS avaló la existencia de las dos especies y a *E. dispar* como una especie morfológicamente idéntica a *E. histolytica* [1]. Este hecho puso de manifiesto la necesidad de reevaluar la epidemiología de la amibiasis en el mundo. 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 [91], Brasil [92] e Irán [93,94], la frecuencia de infección por *E. dispar* es mayor que la de *E. histolytica*. Por otro lado estudios realizados en comunidades de Nicaragua [95], Etiopia [96] y Ghana [97], donde se consideraba que la infección por *E. histolytica* era muy alta, después de utilizar técnicas que permiten diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar*, se encontró que la infección por *E. histolytica* estaba sobre diagnosticada y que la incidencia de *E. dispar* era mayor que la de *E. histolytica*. En nuestro caso, en la comunidad que estudiamos del estado de Morelos, encontramos también que la frecuencia de infección por *E. dispar* es mayor que la de *E. histolytica* de 20.1% y 7.9% respectivamente. Nuestros resultados concuerdan con lo observado en otras partes del mundo. Sin embargo, contrastan con lo reportado en México por Acuña en un estudio realizado en una comunidad del estado de Chiapas [98] y con lo reportado por Newton [99] en un estudio realizado en el Hospital Infantil de México quienes encontraron una frecuencia de infección por *E. histolytica* relativamente alta (11.5% y 78% respectivamente). Por otro lado, en un estudio previo realizado por nuestro grupo, en una comunidad rural ubicada a 100 km al sureste de la comunidad de Tlaltizapan en Morelos la prevalencia por *E. histolytica* fue de 13.8% y de 9.6% para *E. dispar* [23]. 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 huésped) 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 Etiopía, Irán, Brasil o Suecia. Además, es importante señalar que durante todo el estudio no se detectaron casos de amibiasis invasora. En nuestra opinión, el hecho de que la mayoría de aislados pertenecieran a la especie de *E. dispar* considerada no patógena hizo que nuestros individuos en estudio permanecieran como portadores asintomáticos.

Al analizar los resultados en relación a los parásitos encontrados podemos decir que la prevalencia de infección por parásitos intestinales en esta comunidad se puede considerar moderada (23.3%), comparada con los datos de otras comunidades en México, que muestran una prevalencia de alrededor del 38% y el 52% [100,101]. En nuestra opinión basada en las diferencias en las tasas de incidencia de enfermedades intestinales parasitarias a nivel nacional [57], las diferencias en la morbilidad en las diferentes áreas están principalmente relacionadas con la distribución geográfica de las variantes genéticas y de virulencia de las especies infectantes.

En los años 90s surgieron las técnicas en biología molecular que han permitido la diferenciación genética de *E. histolytica* en dos especies diferentes, una *E. histolytica* (especie invasora) y la otra *E. dispar* (especie no invasora). La diferenciación se ha podido hacer mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de DNA (PCR), la cual permite la amplificación de secuencias de DNA específicas de especie tanto para *E. histolytica* como *E. dispar* [40,102]. Actualmente esta técnica se utiliza para estudios diagnósticos y de epidemiología molecular no sólo en amibiasis sino en un gran número de enfermedades infecciosas. Uno de los hallazgos más interesantes surgidos de la utilización de la biología molecular para diferenciar entre dos especies de amibas (*E. histolytica* y *E. dispar*), fue la existencia de portadores asintomáticos de *E. histolytica* y portadores asintomáticos de las dos especies [3]. Este hecho sugiere la existencia de variabilidad en la virulencia de la especie *E. histolytica*.

Recientemente se han podido detectar polimorfismo genético dentro de las dos especies de Entamoeba. Dichos estudios han podido identificar y caracterizar loci

polimórficos en el DNA, los cuales incluyen secuencias codificadoras de proteínas, como son la proteína rica en serina (SRPEh) y de enzimas como la quitinasa, además de regiones no codificadoras de DNA asociadas a los RNA de transferencia [28,31,8]. Estos loci polimórficos han demostrado ser potencialmente útiles para la investigación y estudio de la epidemiología molecular de estos protozoarios.

Asimismo, se han hecho estudios que demuestran la existencia de un polimorfismo considerable en los aislados de *E. histolytica* colectados en diferentes áreas geográficas a nivel mundial: México, Bangladesh y Japón [6,17,21,32,103]. 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 [8]. Por su parte, Zaki y colaboradores [104] también observaron un gran polimorfismo en los aislados de *E. dispar* de Sudáfrica, analizando los segmentos repetidos en serie asociados a los genes del RNA de transferencia (locus 1-2 y 5-6). Este polimorfismo también ha sido observado en aislados de *E. dispar* de Irán [105,106].

En México, Ramos y colaboradores [6,7,23] reportaron un gran polimorfismo al estudiar los segmentos repetidos en tándem en el gen de la quitinasa y de la proteína rica en serina en aislados de *E. dispar* en 2 comunidades del estado de Morelos, encontrando que existían ciertos genotipos que se localizaban principalmente en una u otra de las comunidades estudiadas y distantes una de otra por 2 Km. Asimismo, nosotros en el presente trabajo, hemos observado un gran polimorfismo en los segmentos repetidos en serie asociados a los genes del RNA de transferencia utilizando el marcador molecular NKD3-D5 especie específico de *E. dispar*. Se obtuvieron 8 genotipos diferentes en los aislados de escolares y de sus familiares. En la mayoría de los aislados de *E. dispar*, detectamos que el genotipo 1 fue el más frecuente y que es el mismo de la cepa de referencia *E. dispar* SAW760 (Figura 4). De las tres escuelas estudiadas la escuela Lázaro Cárdenas fue en la que se obtuvieron el mayor número de aislados con 3 distintos genotipos, en donde a excepción del aislado del escolar LC020 que portaba un genotipo diferente al

resto de sus compañeros, cuyos aislados correspondieron al genotipo 1. Este mismo genotipo se encontró en sus familiares más cercanos. También se observó, que en algunos individuos el genotipo no varía a través del tiempo, siendo el mismo incluso en muestras obtenidas con 4 meses de diferencia. Lo anterior sugiere que se trata de un caso de infección persistente (Figura 4, Padre LC009) sin descartar que se pudiera tratar de ciclos de eliminación de la infección y reinfecciones con la misma cepa (Figura 4). En la escuela Emiliano Zapata a pesar que se obtuvieron un número reducido de aislados al analizarlos encontramos 3 genotipos en donde ninguno de los escolares compartió genotipos entre sus compañeros ni con sus familiares, sin embargo el genotipo 1 se encontró presente entre dichos aislados (Figura 4). En nuestra última escuela Sofía Vázquez, ningún niño estuvo parasitado por la especie *E. dispar*. De acuerdo a los resultados obtenidos de los aislados analizados y tomando en cuenta que la escuela Lázaro Cárdenas es la escuela con menor población y que los alumnos provienen básicamente de la misma colonia, con un entorno de mayor pobreza y además es la escuela que presenta un valor menor de índice de higiene (Tabla 5), es la que tiene una mayor prevalencia de infección por parásitos intestinales (28.9%) se esperaría que en particular las amibas fueran más prevalentes y la diversidad genéticas de ellas fuera mayor, sin embargo, como sucede en otras comunidades endémicas [7,103-105,107] los mismos genotipos de *E. dispar* están siendo transmitidos dentro del cerrado grupo de la comunidad escolar y sus respectivas familias. Este hecho ha sido también descrito por Rivera y colaboradores, ellos reportaron la existencia de patrones propios de ciertas instituciones para enfermos mentales, los patrones se limitaban a cierto grupo de pacientes con retraso mental severo que se encontraban aislados y sin interacción con el resto de los pacientes [108].

En contraste, la escuela Emiliano Zapata, presenta la mayor población escolar, los niños vienen de diversas colonias y el índice de higiene es intermedio (Tabla 5). Así mismo, la parasitosis intestinal en este grupo (21.6%) fue el menor de lo reportado en las distintas escuelas, sin embargo, se identificó una gran diversidad de genotipos en los aislados estudiados y básicamente no se obtuvieron indicios de transmisión de algún genotipo en particular, entre los escolares ni con sus familiares.

Al parecer la mayor diversidad de aislados en esta escuela podría deberse a la circunstancia de provenir de diferentes áreas geográficas en la comunidad. Sin embargo, con el número de

aislados analizados con el marcador NKD3-D5 y no haber obtenido secuencias con otros marcadores que nos proporcionaran mayor información para establecer esta relación, nos limita en nuestros hallazgos. No obstante, aunque nosotros tratamos de obtener otros marcadores no siempre fueron exitosos, datos semejante a lo reportado por otros grupos involucrados en la epidemiología molecular de la amibiasis [22,104]. Unas de las explicaciones a este fenómeno es la diferente sensibilidad de los distintos iniciadores que se han utilizado en todos estos estudios [22,104,109]. Otro factor que consideramos importante puede estar influyendo en la falta de resultados positivos en el PCR con algunas muestras, que puede deberse a la naturaleza misma del material biológico del que se parte para la extracción de DNA (directamente de la muestra de materia fecal). Siendo este un DNA ambiental con una alta heterogeneidad en su composición, la amplificación de secuencias de DNA específico para las especies *E. histolytica* y *E. dispar* con diferentes marcadores moleculares hace que técnicamente se dificulte el poder obtener secuencias limpias analizables, que es la circunstancia ideal para este tipo de estudios.

Por otro lado, el estudio comparativo con muestras de DNA de *E. dispar* provenientes de cultivo en medio de Robinson de muestras fecales de la comunidad de Casahuatlán ubicada a 100 km al sureste de la comunidad de Tlaltizapan, en el mismo estado de Morelos, utilizando el marcador NKD3-D5 se obtuvieron los aislados en 3 familias y encontramos que sus secuencias no eran posibles de analizar debido a la obtención de secuencias con dobles picos presentes en los cromatogramas, situación que previamente nos había sucedido con varias muestras de escolares. Una posibilidad para este fenómeno, que de hecho está descrita por diferentes autores entre ellos nuestro grupo, es la existencia de dos genotipos diferentes para un mismo marcador en una única muestra fecal o de material de absceso hepático amibiano [7,110] o la existencia de dos especies presentando una posible infección policlonal como se ha descrito en infecciones por *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma* [111-113]. Por lo cual, se decidió realizar la clonación en estas muestras, en la Figura 6 (ver anexo) se muestran los resultados, observando que en algunos casos se obtuvieron 2 o 3 aislados de una misma muestra, presentando diferentes genotipos (607.07 1°, 607.10 4°, 739.02 1° y 739.02 4°), casos de reinfección por diferente parásito (607.07 1° y 607.07 2°), casos de reinfección por diferentes y los mismos parásitos (739.02 1° y 739.02 4°), así como casos en donde ambos miembros de la familia presentaban el mismo parásito (802.01 4° y

802.07 1°). Al realizar el análisis por motivos se encontró que los aislados correspondían a genotipos distintos a los encontrados en los escolares y sus familiares. Asimismo, no se encontró el genotipo 1 que es el mismo que la cepa de referencia *E. dispar* SAW760 en ninguno de estos aislados. Estos resultados reforzaron lo previamente expuesto en donde la distribución de los genotipos corresponde a la área geográfica, que siendo comunidades del mismo estado y relativamente cercanas, hay una división de genotipos y cada una de las comunidades son infectados por éstos. Al haber obtenido diferentes genotipos en una misma muestra nos habla de co-infecciones por diferente o las mismas amibas.

La prevalencia de *E. histolytica* por PCR en la población escolar fue menor que la encontrada para *E. dispar*. En este caso no se obtuvieron secuencias de *E. histolytica*, sin embargo, consideramos que las cepas infectantes fueron de baja virulencia, ya que la población estudiada se mantuvo asintomática durante y antes del estudio, basándonos en el parámetro de ausencia de cuadros diarreicos atribuibles a infección invasora por *E. histolytica*.

Un punto no discutido hasta el momento, es el gran polimorfismo presente en la cepa *E. dispar*, en relación al marcador molecular especie-específico analizado NKD3-D5 de *E. dispar* (Figuras 3, 6 y 7), se encontró que éste es altamente polimórfico, obteniendo 24 motivos diferentes en los aislados, y que en alguno de los casos se agruparon 2 o 4 secuencias en un mismo motivo ya que la diferencia era la sustitución en un nucleótido. Esto permitió la definición de los patrones de transmisión entre las poblaciones estudiadas, tomando en cuenta el número de repeticiones de los motivos y al hacer una correlación entre los escolares y sus familias. Si comparamos estos resultados con el marcador molecular NK2H3-H5 para *E. histolytica*, en donde se reportan 5 motivos de 8 nucleótidos [114] podemos decir que la *E. dispar* presenta un mayor polimorfismo. En el caso del marcador molecular D-A, Morajad y colaboradores en el 2009, encontraron los mismos resultados es decir que *E. histolytica* presenta menor polimorfismo que *E. dispar* [105].

En relación a la diversidad genética en los aislados obtenidos de *E. dispar* con el marcador molecular NKD3-D5 (Tabla 8) se puede considerar baja, obteniendo 6 genotipos de 19 secuencias (escolares y familiares) con 8 sitios segregativos (Ss) y valores de π de

0.00337 y de θ de 0.00622. Al realizar el análisis con el total de las secuencias de *E. dispar* los valores obtenidos fueron los siguientes: 8 genotipos de 22 secuencias, con 9 Ss y valores de π y θ de 0.00114 y 0.00185 respectivamente, mostraron también una baja diversidad. Al comparar estos resultados con un estudio previo realizado por nuestro grupo, en muestras obtenidos de material de drenado de absceso hepático con el marcador molecular D-A para *E. dispar* contrastan con nuestros resultados, ya que en este grupo la diversidad genética fue alta considerando que no existen antecedentes de estudios de diversidad genética medida a través del número de sitios segregativos y las tasas de π y θ [26]. La baja diversidad obtenida en los aislados de Tlaltizapan sugiere que unas pocas secuencias están presentando la mayoría de todos los sitios segregativos.

La epidemiología molecular no es una disciplina nueva esta aparece desde los años 70. En el caso de *E. histolytica* y *E. dispar* su variación genética ha sido estudiada desde los años 90, el blanco de estudio han sido regiones codificadoras y no codificadoras de DNA. Este hecho ha sido de gran utilidad para estudiar las diferentes formas clínicas de la infección, la distribución geográfica y la modalidad de cepas importantes epidemiológicamente entre diferentes grupos de individuos de una u otra área geográfica, en una ciudad o entre diferentes países o continentes, de ahí su utilidad en el estudio de los patrones de transmisión de la amibiasis y sus vínculos epidemiológicos entre las infecciones asintomáticas y sintomáticas [15,115].

En relación a la dinámica de la infección en el presente estudio, utilizando la caracterización molecular de las especies infectantes en los escolares y familiares cercanos, los resultados no permiten establecer la fuente de la infección original ni determinar si dicha fuente es intra y/o extraescolar. El genotipo 1 fue el más frecuentemente encontrado y es el correspondiente a la cepa de referencia *E. dispar* SAW760, cuyo genotipo está ampliamente distribuido alrededor del mundo. Es posible que el que hayamos encontrado más frecuentemente dicho genotipo nos impida definir en qué sentido se desarrolla la transmisibilidad en los grupos estudiados, sin embargo, explica claramente el carácter comensal del parásito y la ausencia de sintomatología clínica en los individuos estudiados durante los 12 meses de seguimiento, lo cual es totalmente explicable en una infección por esta cepa de la especie *E. dispar* en general no patógena.

Por el contrario, existe una gran diferencia en la variabilidad genética entre los municipios de Casahuatlán y Tlaltizapan; en Casahuatlán se identificaron genotipos de *E. dispar* diferentes, con lo que se demuestra una distribución geográfica de los genotipos particulares entre ambas poblaciones, lo que sugiere que algunas cepas pueden ser autóctonas en una comunidad y tener una baja movilidad geográfica (Figura 8). Nuestros resultados aportan conocimientos adicionales en relación a la característica de distribución geográfica de genotipos particulares o únicos y otros distribuidos muy ampliamente en la geografía mundial. Consideramos que todos estos datos son importantes desde el punto de vista epidemiológico para entender mejor la distribución y transmisión del parásito entre diferentes comunidades.

CONCLUSIONES

Las variables demográficas de la escuela e intrafamiliares de los niños estudiados no determinan la infección por parásitos intestinales, lo que sugiere la existencia de una fuente de propagación de parásitos intestinales distinta en el medio ambiente y no descarta la susceptibilidad del huésped a la infección y/o la virulencia de la especie infectante.

En ninguno de los casos en los que se detectó la presencia de parásitos intestinales se desarrolló un proceso invasor atribuible a la infección por *E. histolytica*, tal vez este hecho pudiera corresponder al establecimiento de una relación simbiótica entre el hospedero y el parásito en aquellos escolares en que se detectó *E. histolytica*.

El hecho de que el genotipo 1 de la *E. dispar* aislada de los escolares estudiados, haya sido el más frecuentemente encontrado y que además corresponde a la cepa de referencia *E. dispar* SAW760, sugiere fuertemente la amplia distribución en la comunidad de este genotipo de *E. dispar* en la comunidad estudiada y no a una fuente de infección particular o restringida.

El estudio de la distribución de genotipos distintos en una misma región geográfica o en individuos en comunidades cerradas, permite establecer vías de transmisión, en este caso en particular de *E. histolytica* y *E. dispar*.

LITERATURA CITADA

1. World Health Organization. 1997. Amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec, 72:97.
2. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmo M, Corrales J, Moreira J. 2002. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* complex; a study of incidence in a remote rural area of Ecuador. Am J Trop Med Hyg, 67:123.
3. Gathiram V, Jackson T.F.H.G. 1987. A longitudinal study of asymptomatic carries of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. S Afr Med J, 72:669.
4. Caballero-Salcedo A, Viveros-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.
5. Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal (México). <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/indexhtm>.
6. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García de León MC, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. 2005a. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Prevalence infection in a rural mexican community. Exp Parasitol, 110:327.
7. Ramos F, García G, Valadez A, Morán P, González E, Melendro EI, Valenzuela O, Ximénez C. 2005b. *E. dispar* strain: analysis of polymorphism as a tool for studying geographic distribution. Mol Biochem Parasitol, 141:175.
8. Gosh S, Frisardi M, Ramírez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramírez 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.

9. Clark CG, Diamond LS. 1992. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. Arch Med Res, 23:15.
10. Morán P, Ramos F, Ramiro M, Curiel O, González E, Valadez A, Gómez A, García G, Melendro EI, Ximénez C. 2005. Infection by human immunodeficiency virus-1 is not a risk factor for amebiasis. Am J Trop Med Hyg, 73:296.
11. 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.
12. Petri WA Jr, Haque R, Lysterly D, Vines RR. 2000. Estimating the impact of amebiasis in health. Parasitol Today, 16:320.
13. Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. Med Int Mex, 23:398.
14. Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. 2008a. Molecular epidemiology of amebiasis. Infect Genet Evol, 8:698.
15. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of art Infect. Genet Evol, 9:1023.
16. Kretschmer RR. 1990. Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica* Boca Raton. FL: CRC Press. 59-60.
17. Morán P, Gómez A, Valadez A, García G, Ramos F, González E, Limón A, Riebeling C, Valenzuela O, Rojas L, Melendro EI, Ximénez C. Periodicity and patterns of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in HIV+/AIDS patients in Mexico. Ann Trop Med Parasitol, 103:307.

18. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, Cerritos R, González E, Hernández E, Oswaldo P. 2011. Novelties on amoebiasis: A neglected tropical disease. *J Global Infect Dis*, 13:66.
19. Walsh JA. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*, 8:228.
20. WHO/PAHO/UNESCO. 1997. Report of a consultation of experts on amoebiasis. *Weekly Epidemiol Rec*, 72:97.
21. Nozaki T, Kobayashi S, Takeuchi T, Haghghi A. 2006. Diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. *Arch Med Res*, 37:277.
22. Ali IK, Solaymani-Mohammadi S, Akhter J, Roy S, Gorrini C, Calderaro A, Parker SK, Haque R, Petri WA Jr, Clark CG. 2008. Tissue invasion by *Entamoeba histolytica*: evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism. *PLoS Negl Trop Dis*, 2:e219.
23. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, DE León M del C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. 2005b. High prevalence rate of *E. histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg*, 73:87.
24. Shibayama M, Dolabella SS, Silva EF, Tsutsumi V. 2007. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amebic liver abscess in hamsters. *Ann Hepatol*, 6:117.
25. Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. 2006. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E histolytica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48:245.

26. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. 2010. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health*, 7:1105.
27. Clark CG, Diamond LS. 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol*, 77:450.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Clark CG, Ali IK, Kaki M, Loftus BJ, Hall N. 2006. Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 146:24.
32. Ayeh-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA Jr, 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.
33. Ali IK, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA Jr, Clark CG. 2007. Evidence for the link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 45:285.
34. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection Kits. *J Clin Microbiol*, 33:2558.

35. Tawari B, Ali IK, Scott C, Quail MA, Berriman M, Hall N, Clark CG. 2008. Patterns of Evolution in the unique tRNA Gene Arrays of the Genus *Entamoeba*. *Mol Biol Evol*, 25:187.
36. EpiInfo versión 6. [[http:// wwwcdc.gov/epiinfo/html/ei6](http://www.cdc.gov/epiinfo/html/ei6)]
37. Tabla de crecimiento del Centro para el Control y la Prevención de las enfermedades [<http://www.cdc.gov/growthcharts/>].
38. Lanzkowsky P. 2011. Hematological Reference Values In Manual of Pediatric Hematology and Oncology EE UU: Academy Press Elsevier; Appendix 1.
39. 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.
40. Clark CG. 1993. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by ribotyping In: Persing C Smith T E White T J (Ed). Diagnostic molecular microbiology ASM Press Washington D C. 468-474.
41. Hall TA. 1999. BioEdit: user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41:95.
42. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25:4876.
43. Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19:2496.
44. Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16:10881.

45. Roberts LS, Janovy JJ. 2005. Foundations of Parasitology 7thed New York: McGraw-Hill.
46. Pullman R, Brooker S. 2008. The health impact of polyparasitism in humans: are we underestimating the burden of parasitic diseases? *Parasitology*, 135:783.
47. Morales-Espinoza EM, Sánchez-Peréz HJ, García-Gil M. del M, Vargas-Morales G, Méndez-Sánchez J.D, Pérez-Ramirez M. 2003. Intestinal parasites in children in highly deprived areas in the border region of Chiapas Mexico. *Salud Publica Mex*, 45:379.
48. Tay J, Ruiz A, Schenone H, Rober L, Sánchez-Vega JT, Uribarren T, Becerril MA, Romero R. 1994. Frequency of intestinal protozoois in the Mexican Republic. *Bol Chil Parasitol*, 49:9.
49. Nematian J, Nematian E, Gholamrezanezhad A, Asgari AA. 2004. Prevalence of intestinal parasitic infections and their relation with socioeconomic factors and hygienic habits in Tehran primary school students. *Acta Trop*, 92:179.
50. Crompton DWT, Montresor A, Nesheim MC, Savioli L. 2003. Controlling disease due to helminth infection. Geneva:WHO.
51. Ulukanligil M, Seyrek A. 2003. Demographic and parasitic infection status of schoolchildren and sanitary conditions of schools in Sanliurfa Turkey. *BMC Public Health*, 3:29.
52. Scolari C, Torti C, Beltrame A, Matteelli A, Castelli F, Gulletta M, Ribas M, Morana S, Urbani C. 2000. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth (STH) infections in urban and indigenous schoolchildren in Ortigueira State of Paraná, Brasil: implications for control. *Trop Med Int Health*, 5:302.
53. Pawlowski SW, Warrem CA, Guerrant R. 2009. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*, 136:1874.

54. Chan MS. 1997. The global burden of intestinal nematode infections: fifty years on. *Parasitol Today*, 13:438.
55. Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. 2000. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology*, 121 suppl:S23.
56. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN. 2007. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49:147.
57. Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal (México). Anuarios de Morbilidad [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/index.html>].
58. Yaicharoen R, Ngrenngamlert W, Wongjindanon N, Sripochang S, Kiatfuengfoo R. 2006. Infection of *Blastocystis hominis* in primary schoolchildren from Nakhon Pathom province, Thailand. *Trop Biomed*, 23:117.
59. Baldo ET, Belizario VY, De Leon WU, Kong HH, Chung DI. 2004. Infection status of intestinal parasites in children living in residential institutions in Metro Manila the Philippines. *Korean J Parasitol*, 42:67.
60. Nascimento SA, Moitinho Mda L. 2005. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga City Paraná State Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 47:213.
61. Min K, Busarat C, Sang-a-gad P, Pungpak S, Singhasivanon P, Karbwang J. 1994. Clinical studies on *Blastocystis hominis* infection in immunocompromised patients. *J Trop Med Parasitol*, 17:1.

62. Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. 1999. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol*, 15:389.
63. Zali MR, Mehr AJ, Rezaian M, Meamar AR, Vaziri S, Mohraz M. 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. *Jpn J Infect Dis*, 57:268.
64. Stenzel DJ, Boreham PF. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*, 9:563.
65. Tan KS. 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet Parasitol*, 126:121.
66. Alexeieff A. 1911. Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *CR Soc Biol*, 71:296.
67. Brumpt E. 1912. *Blastocystis hominis* n sp. et forms voisines. *Bull Soc Pathol Exot*, 5:725.
68. Nimri L, Batchoun R. 1994. Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic schoolchildren with *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol*, 32:2865.
69. Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A. 2003. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thai*, 86 Suppl 2:S263.
70. Johnston AR, Gillespie TR, Rwego IB, McLachlan TL, Kent AD, Golberg TL. 2010. Molecular Epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in Western Uganda. *PLoS Negl Trop Dis*, 4:e683.

71. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. 2004. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implication for public health. Clin Microbiol Rev, 17:72.
72. Abe N. 2004. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Vet Parasitol, 120:235.
73. Albonico M, Allen H, Chitsulo L, Engels D, Gabrielli AF, Savioli L. 2008. Controlling soil-transmitted helminthiasis in pre-school age children through preventive chemotherapy. PLoS Negl Trop Dis, 2:e126.
74. Noël I, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implication for genetic diversity identification or species and zoonosis. J Clin Microbiol, 43:348.
75. Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer M. 2004. Effect on Giardia infection on growth and psychomotor development of children aged 0–5 years. J Trop Pediatr, 50:90.
76. Ouattara M, N’Gue’ssan NA, Yapi A, N’Goran EK. 2010. Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d’Ivoire). PLoS Negl Trop Dis, 4:e574.
77. Raso G, Luginbuhl A, Adjoua CA, Tian-Bi TN, Silue’ KD, Matthys B, Vounatsou P, Wang Y, Dumas ME, Holmes E, Singer BH, Tanner M, N’goran EK, Utzinger J. 2004. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d’Ivoire. Int J Epidemiol, 33:1092.
78. Ali SA, Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. Curr Opin Infect Dis, 16:453.
79. Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. 2004. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. Semin Pediatr Infect Dis, 15:229.

80. Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. 1986. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr*, 43:395.
81. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*, 16:1135.
82. Adam RD. 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol*, 30:475.
83. Lu S, Li J, Zhang Y, Wen J, Wang F. 2002. The intraspecific difference of triose phosphate isomerasa (*tim*) gene from *Giardia lamblia*. *Chin Med J*, 115:763.
84. Molina N, Pezzani B, Ciarmela M, Orden A, Rosa D, Apezteguía M, Basualdo J, Minvielle M. 2011. Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso Argentina. *J Infect Dev Ctries*, 27:527.
85. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoresic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 111:11.
86. Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14:447.
87. Homan W, Mank T. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol*, 31:822.
88. Eligio-García L, Cortes-Campos A, Jimenez-Cardoso E. 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitol Res*, 97:1.
89. Lalle M, Jimenez-Cardoso E, Caccio S, Pozio E. 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol*, 91:203.

90. Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, Tannich E. 2003. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol*, 41:4745.
91. 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.
92. Pinheiro SM, Carneiro RM, Aca IS, Irmão JI, Morais MA Jr, Coimbra MR, Carvalho LB Jr. 2004. Determine of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 70:221.
93. Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghighi A, Azimi Rad M, Mesgarian F, RostamiNejad M, Zali MR. 2007. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Gonbad City, 2006. *Iranian J Parasitol*, 2:48.
94. Hooshyar H, Rezaian M, Kazemi B, Jeddi-Tehrani M, Solaymani-Mohammadi Sh. 2004. The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central, and southern Iran. *Parasitol Res*, 94:96.
95. 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, triagle parasite panel and PCR study. *Arch Med Res*, 37:529.
96. 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.

97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Rodríguez E, Mateos B, González JC, Aguilar YM, Alarcón E, Mendoza AS, Mier M, Mora MA, Bernal RM. 2008. Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro de Guerrero, México. Parasitología Latinoamérica, 63:20.
101. Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 6:17.
102. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG. 2002. Simultaneous differentiation and Typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J Clin Microbiol, 40:1271.
103. 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.
104. 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.

105. Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, Kazemi B, Rostami Nejad M, Abadi A, Reza Zali M. 2009. High genetic diversity among Iranian *Entamoeba dispar* isolates based on the noncoding short tandem repeat locus D-A. *Acta Trop*, 111:133.
106. Nazemalhosseini-Mojarad E, Azimirad M, Nochi Z, Romani S, Tajbakhsh M, Rostami-Nejad M, Haghighi A, Zali MR. 2012. Sequence Diversity in tRNA Gene Locus A-L among Iranian Isolates of *Entamoeba dispar*. *Iran J Parasitol*, 7:97.
107. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. 2003. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol*, 41:3748.
108. 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.
109. 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.
110. Valenzuela O, Morán P, Ramos F, Cardoza JI, García G, Valadez A, Rojas L, Garibay A, González E, Ximénez C. 2009. Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report. *Am J Trop Med Hyg*, 80:51.
111. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. 2004. *Leishmania* (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol*, 108:59.
112. 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.

113. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*, 156:1805.
114. Escueta-de Cadiz A, Kobayashi S, Takeuchi T, Tachibana H, Nozaki T. 2010. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol Int*, 59:75.
115. Boffeta P. 2000. Molecular epidemiology. *J Inter Med*, 248:447.
116. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrooks J. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.

Diseño Gráfico: manipulación, edición y diseño de imágenes, páginas 10, 15, 28, 30, 33, 66, 67 y 68.

Lic. en D.G. María de Lourdes Alonso de la Rosa.

ANEXO

La infección por *E. histolytica* tiene un amplio rango de modalidades clínicas en el huésped humano que van desde la infección luminal del intestino que cursa totalmente asintomática, hasta las formas de infección invasora intestinal y extraintestinal. Un gran número de personas colonizadas por *E. histolytica* o *E. dispar* eliminan espontáneamente la infección en periodos relativamente cortos (menos de 3 meses) [3], algunos otros pueden ser portadores persistentes y permanecer infectados por largo tiempo excretando quistes en las heces hasta por dos años. *E. dispar* está considerado como un organismo que no causa daño en el humano. Sin embargo, tanto *E. histolytica* como *E. dispar* son especies muy polimórficas tanto en regiones codificadoras del DNA como en regiones no codificadoras. Este polimorfismo se ha utilizado como herramienta para intentar relacionar el polimorfismo con las formas clínicas de la amibiasis, así como para estudiar la epidemiología molecular de ambas especies en diferentes regiones endémicas del mundo [6,7,104].

El polimorfismo entre algunas cepas de *E. dispar* provenientes de diferentes partes del mundo así como de distintas áreas geográficas en un mismo país o estado, nos ha llevado a identificar que ciertos genotipos son exclusivos de un grupo o población específica. A este respecto nuestro grupo ha hecho aportaciones en el estudio de la epidemiología molecular de *E. histolytica* y *E. dispar* en México, dichos estudios han estado dirigidos a la evaluación de la prevalencia de infección y la morbilidad por *E. histolytica* y *E. dispar* en nuestro país [6,7,15].

En el año 2005, nuestro grupo trabajo en las comunidades de Casahuatlán y Cuahuixtla localizadas en el estado de Morelos, en donde los resultados obtenidos por Ramos y colaboradores, reportaron un gran polimorfismo al estudiar los segmentos repetidos en tándem en el gen de la quitinasa y de la proteína rica en serina en aislados de *E. dispar* en 2 comunidades del estado de Morelos, encontrando que existían ciertos genotipos que se localizaban principalmente en una u otra de las comunidades estudiadas, en donde la distancia de una comunidad a otra era de 2 Km. Partiendo de este hecho surgió la inquietud de conocer si los genotipos encontrados en la comunidad de Tlaltizapan eran exclusivos de esta comunidad o por el contrario eran característicos por lo menos en el estado de Morelos.

Con el fin de responder a este hecho, se amplificaron por PCR las muestras de DNA de *E. dispar* provenientes de cultivo en medio de Robinson de muestras fecales de 3 familias de la comunidad de Casahuatlán, utilizando el marcador NKD3-D5, y los productos fueron enviados para su secuenciación.

Desafortunadamente las secuencias obtenidas de estos aislados, no fue posible analizarlas debido a la obtención de secuencias con dobles picos presentes en los cromatogramas por lo cual, se decidió clonar los amplificados obtenidos de las PCR de las muestras, para comparar los genotipos de Casahuatlán con los genotipos obtenidos de los escolares y sus familiares de la comunidad de Tlaltizapan.

Clonación de los Productos de PCR

Los amplificados obtenidos de las PCR se clonaron en el vector pCR[®]2.1 vector (25ng/μl), siguiendo el protocolo de clonación del TA Cloning[®] kit (Invitrogen). La fase de ligación se realizó en un volumen de 10 μl, las condiciones de la reacción fueron las siguientes: H₂O, amortiguador de ligación 10X, pCR[®]2.1 vector (25 ng/μl), producto fresco de PCR (inserto), DNA ligasa T4. La reacción se dejó incubar toda la noche a una temperatura de 14-15°C (Eppendorf, ThermoStat *plus*). Posterior a la incubación los viales fueron brevemente centrifugados y colocados en hielo. A continuación se transformaron las bacterias competentes *E. coli* (OneShot[®] INVaF' Chemically competent) (1X10⁷ células/ml) 50 μl por cada μl(1) de la reacción de ligación y se dejaron incubar por 30 minutos en hielo. Posterior a la incubación se introdujo el plásmido en la bacteria por choque térmico a 42°C durante 30 segundos sin agitar, inmediatamente los viales se transfirieron al hielo. Las bacterias recombinantes se incubaron durante 1 hora a 37°C en medio S.O.C (0.2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM detroxa), para finalmente sembrarlas en cajas de agar LB/ampicilina (100 μg/ml)/ Xgal (100 mg/ml) y se crecieron durante toda la noche a 37°C.

Las colonias blancas que son las recombinantes se picaron y se sembraron en medio líquido *Terrific broth* (TB) complementado con ampicilina para proceder con la purificación de los plásmidos, utilizando la técnica tradicional de Minipreps [116] o en su caso por extracción

con el estuche comercial *Plasmid mini kit*, (Biorad, Hercules, Ca. USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Obtenido el plásmido con el inserto se procedió a la realización de la PCR con la metodología previamente descrita continuando con el proceso de secuenciación de los insertos.

Resultados.- En algunos casos se obtuvieron 2 o 3 aislados de una misma muestra, presentando diferentes genotipos (607.07 1°, 607.10 4°, 739.02 1° y 739.02 4°), casos de reinfección por diferente parásito (607.07 1° y 607.07 2°), casos de reinfección por diferentes y los mismos parásitos (739.02 1° y 739.02 4°), así como casos en donde ambos miembros de la familia presentaban el mismo parásito (802.01 4° y 802.07 1°), representados en la Figura 6. Al realizar el análisis por motivos se encontró que los aislados correspondían a genotipos distintos a los encontrados en los escolares y sus familiares (Figura 7 y 8). Asimismo, no se encontró el genotipo 1 que es el mismo que la cepa de referencia *E. dispar* SAW760 en ninguno de estos aislados. Los resultados apoyan fuertemente lo previamente expuesto en donde la distribución de los genotipos es altamente limitada y estos parecen corresponder a una área geográfica en particular aun tratándose de comunidades del mismo estado y relativamente cercanas, sugiriendo la existencia de cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* con diferente movilidad geográfica, representadas en este caso por genotipos con una muy baja movilidad como el caso de las cepas descritas en Casahuatlán y la tipo SAW760 de *E. dispar* con una gran distribución a nivel mundial.

CASAHUATLÁN

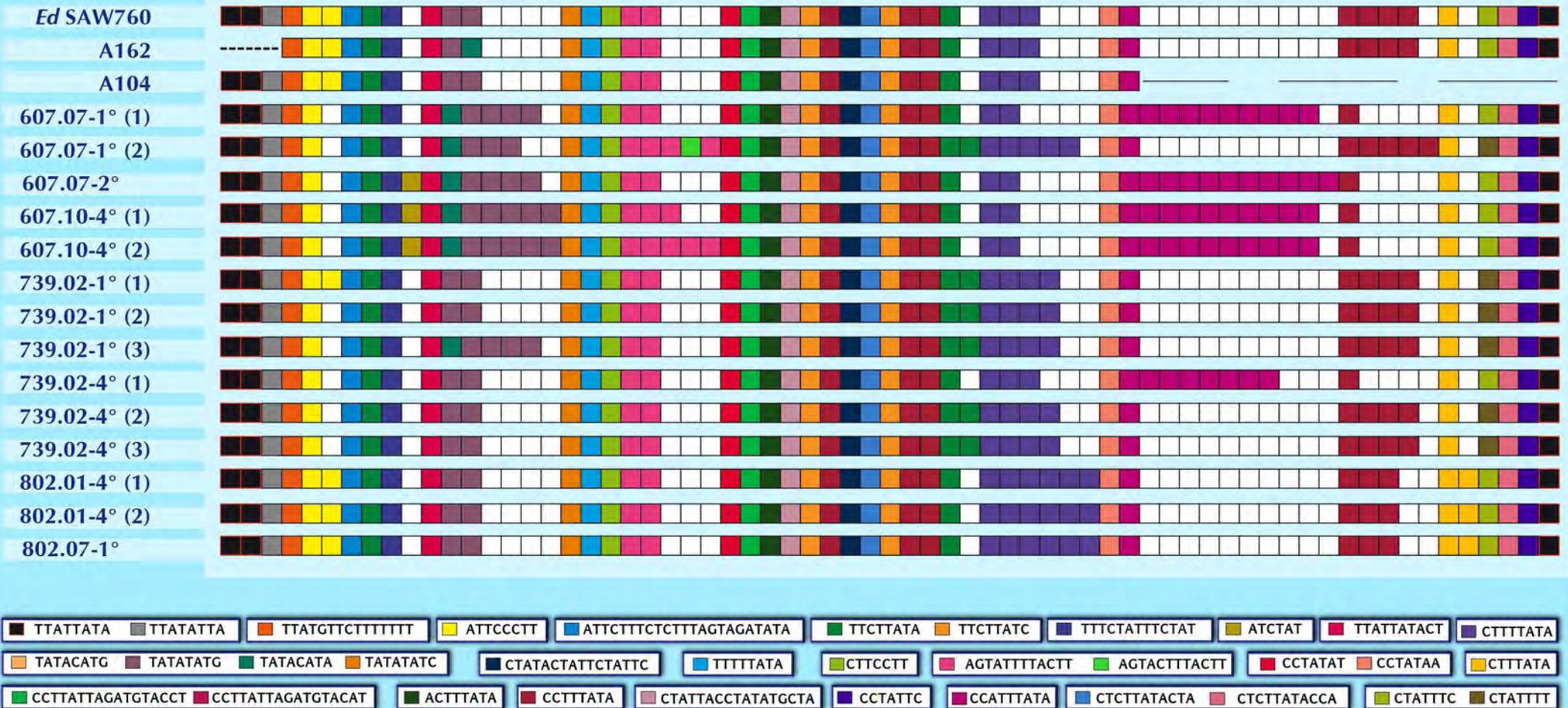


FIGURA 6. Representación esquemática de los motivos encontrados en los aislados de 3 familias de la comunidad de Casahuatlán y secuencias reportadas en el GenBank con el marcador molecular NKD3-D5 para *E. dispar*.

TLALTIZAPAN

CASAHUATLÁN

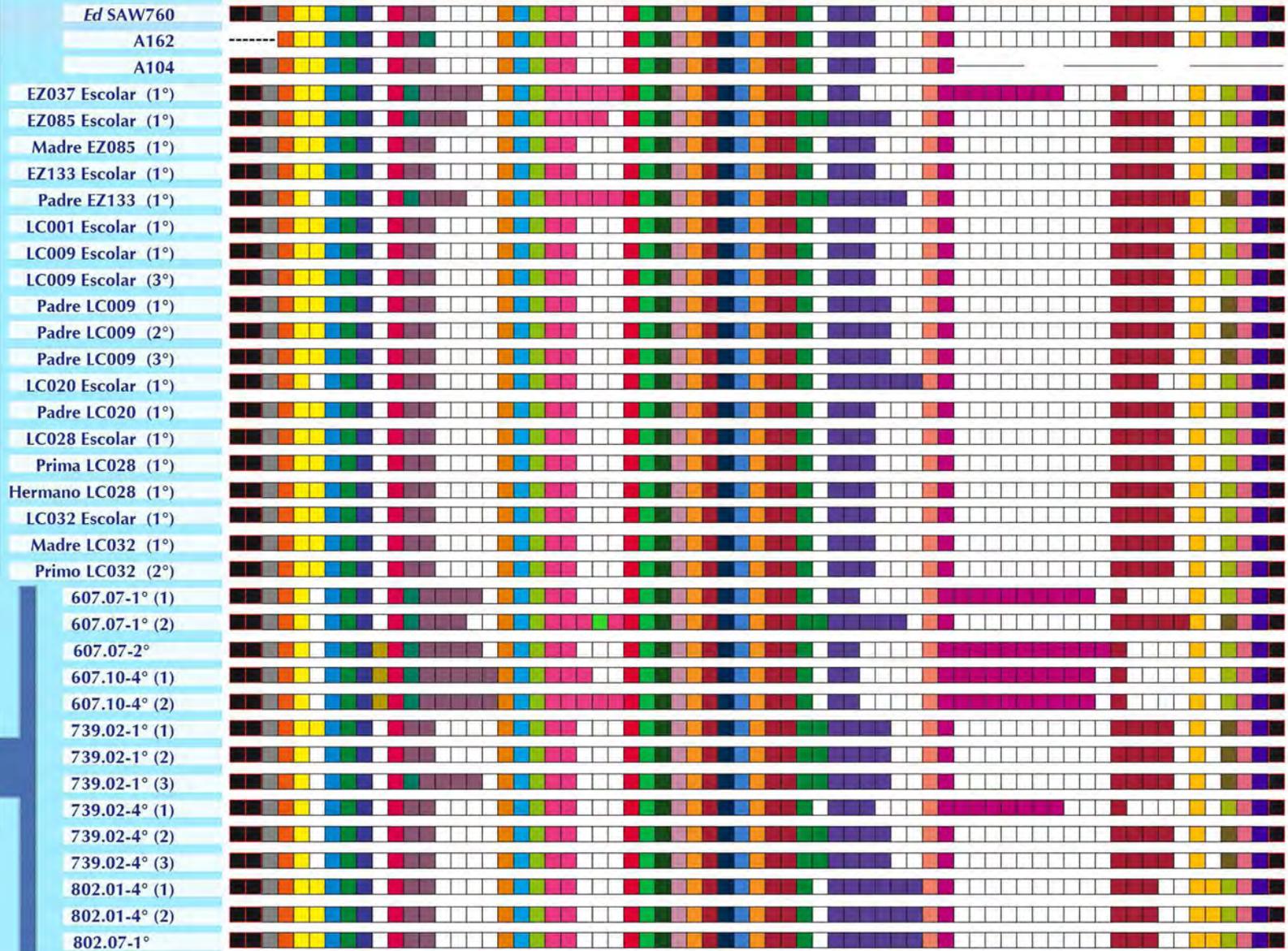


FIGURA 7. Representación esquemática de los motivos encontrados en los aislados de Tlaltizapan, Casahuatlán y secuencias reportadas en el GenBank con el marcador molecular NKD3-D5 para *E. dispar*.

- TTATTATA
- TTATATTA
- TTATGTTCTTTTTT
- ATTCCCTT
- ATTCCTTCTCTTTAGTAGATATA
- TTCTTATA
- TTCTTATC
- TTTCTATTTCTAT
- ATCTAT
- TTATTATACT
- TATACATG
- TATATATG
- TATACATA
- TATATATC
- CTACTACTATTCTATTC
- TTTTTATA
- CTTCCTT
- AGTATTTTACTT
- AGTACTTTACTT
- CCTATAT
- CCTATAA
- CTTTATA
- CTATTTTC
- CTATTTT
- CCTATTAGATGTACCT
- CCTATTAGATGTACAT
- ACTTTATA
- CCTTTATA
- CTATTACCTATATGCTA
- CCTATTC
- CCATTTATA
- CTCTTATACTA
- CTCTTATACCA
- CTTTATA



FIGURA 8. Distribución de genotipos en las comunidades de Tlaltizapan y Casahuatlán en el estado de Morelos.