

Diferenciación del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* mediante Gal/GalNAc-lectina y PCR en aislamientos colombianos

OMAIRA Y. LÓPEZ^{2,a}, MYRIAM C. LÓPEZ^{2,a}, VLADIMIR CORREDOR^{2,b},
M. CLARA ECHEVERRÍ², ANÁLIDA E. PINILLA^{1,c}

¹ Departamento de
Medicina Interna.

² Departamento de
Salud Pública.
Facultad de Medicina,
Universidad Nacional de
Colombia.

^aBacterióloga.

^bBiólogo. MSc. en
Educación.

Fuente de apoyo
financiero: Código 5443
División Investigación
Sede Bogotá. Universidad
Nacional de Colombia.

Recibido el 3 de junio de
2011, aceptado el 21 de
diciembre de 2011.

Correspondencia a:
Análida Elizabeth Pinilla
Roa. MD. I. Departamento
de Medicina Interna.
Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de
Colombia.
Carrera 45 No 26-85 -
Edificio Uriel Gutiérrez.
Bogotá D.C. - Colombia.
Facultad de Medicina.
Bogotá, Colombia.
Teléfono (57-1) 3165000
extensión 15167/15033.
aepinillar@unal.edu.co

Differentiation of *entamoeba histolytica* from *entamoeba dispar* using Gal/GalNAc-lectin and polymerase chain reaction

Background: *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are morphologically identical. However, the former is highly pathogenic and the latter is not. **Aim:** To differentiate *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* through ELISA and PCR techniques in Colombian isolates from feces. **Material and Methods:** Descriptive study of Colombian fecal samples from 53 males and 47 women, that were positive for the complex *E. histolytica/E. dispar* on light microscopy. Positive samples were cultured on Robinson medium to isolate trophozoites. The presence of specific Gal/GalNAc-lectin was determined by ELISA and polymerase chain reaction in genomic DNA, using the combination of three nucleotides that recognize a variable region of 16S small subunit ribosomal RNA, generating a 166 base pair (bp) product for *E. histolytica* and 752 pb product for *E. dispar*. **Results:** After verification, only eight of the 100 samples were positive for the complex *E. histolytica/E. dispar* and were cultivated. Isolates were obtained in six cultures, one corresponded to *E. histolytica* and six to *E. dispar*. **Conclusions:** The presence of *E. histolytica/E. dispar* complex was largely overestimated with light microscopy. In the few samples where isolates were obtained, the technique described differentiated between both strains.

(Rev Med Chile 2012; 140: 476-483).

Key words: Dhg12; *Entamoeba dispar*; *Entamoeba histolytica*; Galectins.

La disentería amebiana y sus complicaciones es causada por el protozoo *Entamoeba histolytica*. Antes de la década de 1990-99, se estimaba en 500 millones las personas infectadas en el mundo. Estudios bioquímicos, inmunológicos y genómicos confirmaron la hipótesis de Brumpt sobre la existencia de dos especies, una patógena y otra no patógena, morfológicamente idénticas, constituyendo un complejo –*Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*–, diferenciables sólo mediante patrones isoenzimáticos, la presencia o ausencia de adhesina, o mediante técnicas moleculares¹⁻⁴.

En la amebiasis intestinal, el diagnóstico habitual de laboratorio se fundamenta en el estudio microscópico de la materia fecal, el cual tiene la gran limitación de no permitir hacer la diferencia entre *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* pero si con *E. hartmanni* por tamaño. La detección de la lectina de galactosa y N acetil galactosamina (Gal/GalNAc-lectina) en materia fecal mediante la técnica de ELISA y la amplificación por PCR de fragmentos específicos de ADN genómico sí permiten identificar las especies del complejo, siendo técnicas de elección para el diagnóstico diferencial de estas especies⁵⁻⁷.

En Colombia, la encuesta de morbilidad de 1980 informó una prevalencia para *E. histolytica* de 12,1%⁸. Años más tarde, la OMS (1997) reglamentó reportar en materia fecal el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*. Por esto, se realizaron estudios puntuales para diferenciar estas dos especies mediante ELISA para la detección de la Gal/GalNAc-lectina en materia fecal; las frecuencias relativas comunicadas, fueron de 0,6-1,4% para *E. histolytica* y de 15-17% para *E. dispar*^{9,10}. En otros países, como Venezuela, mediante PCR se informó una prevalencia para *E. histolytica* 6,31% y para *E. dispar* 4,44%¹¹; en Nicaragua reportaron para *E. histolytica* 1,5% y para *E. dispar* 7,5%¹² y en México se reportaron las siguientes prevalencias *E. histolytica* de 11,4% y para *E. dispar* 7,2% y con ambas especies del 2,4%¹³.

El objetivo del presente trabajo fue diferenciar las especies *E. histolytica* y *E. dispar* mediante las pruebas de ELISA y PCR en muestras de materia fecal de pacientes, de diferentes ciudades de Colombia, y a quienes se les había diagnosticado por microscopía de luz la presencia de quistes del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*; no se tuvo en cuenta la historia clínica. La aplicación de estas técnicas en el diagnóstico de la amebiasis, podrá ser la base para estudios epidemiológicos que permitan determinar la prevalencia real de la infección por *E. histolytica*.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo entre julio de 2007 y abril de 2008, en la medida que las muestras eran remitidas al centro de referencia de parasitología, procedentes de diferentes laboratorios con diagnóstico de quistes del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*, mediante microscopía de luz. En el formato de remisión de la muestra, se registró género y procedencia, sin importar el motivo de consulta y la enfermedad actual.

Luego de verificar las muestras realmente positivas para el complejo *E. histolytica*/*E. dispar* en el centro de referencia (sólo 8/100), se cultivaron en medio de Robinson¹⁴ para lograr el aislamiento, recuperación y congelación de trofozoítos. A partir de éstos, se determinó la presencia de la Gal/GalNAc-lectina específica mediante ELISA utilizando el kit Techlab *E. histolytica* II test[®] de segunda generación¹⁵.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR), muestras y controles

Para la PCR, el ADN de los trofozoítos concentrados y congelados fue extraído siguiendo la técnica de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI 25:24:1) y almacenados a -20°C hasta su uso¹⁶. Los trofozoítos fueron congelados inicialmente en nitrógeno líquido a -196°C y llevados posteriormente a -20°C. Los controles positivos utilizados para la realización del PCR, correspondieron a ADN obtenido a partir de cultivos axénicos en medio TYS-33 de *E. histolytica* HM1: ISS; el ADN de *E. dispar* SAW760 fue proporcionado por el Dr. Graham Clark del London School of Hygiene and Tropical Medicine. Como control negativo se utilizó ADN proveniente de una muestra de materia fecal de un individuo sano, que fue negativo por diagnóstico parasitológico de microscopía de luz y por ELISA¹⁵. Los controles negativo y positivo de *E. histolytica* HM1: ISS también fueron congelados inicialmente en nitrógeno líquido a -196°C y llevados posteriormente a -20°C.

Los tres oligonucleótidos empleados en PCR fueron descritos por Hamzah et al¹⁶. La mezcla de los tres oligonucleótidos permite la amplificación específica de ADN genómico de *E. histolytica* y *E. dispar*. La secuencia del oligonucleótido sentido (EntaF) representa la región central del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal, conservada en ambas especies de *Entamoeba*; los oligonucleótidos antisentido EhR y EdR, específicos para *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente, representan secuencias variables del mismo gen. Las siguientes fueron las secuencias: EntaF: 5'-ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT-3'; EhR: 5'-GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T-3'; EdR: 5'-CAC CAC TTA CTA TCC CTA CC-3'. La combinación de oligonucleótidos en una misma mezcla de reacción generó de manera específica, productos de 166 pb para el ADN de *E. histolytica* y de 752 pb para el ADN de *E. dispar*¹⁷.

Amplificación por PCR y diferenciación de especies

La mezcla de reacción se realizó con 1,25 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0,2 µM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 6 mM de MgCl₂, 0,05 U/ µl de *Taq* polimerasa, 1X de *Taq* buffer, y 4 µl del ADN extraído, para un volumen final de 20 µl de mezcla de reacción. La amplificación de los fragmentos de ADN espe-

cíficos de cada especie se inició con una primera desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio^{16,17}.

Determinación de sensibilidad y especificidad de oligonucleótidos

Para determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos, diferentes concentraciones del ADN de *E. histolytica* HM1:ISS y *E. dispar* SAW760 fueron preparadas mediante diluciones seriadas 1:10, obteniendo amplificación desde 4 ng hasta 0,02 pg de ADN de *E. dispar* y desde 14 ng hasta 0,01 pg del ADN de *E. histolytica*. La combinación de los ADN de las cepas control fue probada en PCR para eliminar la posibilidad de amplificación cruzada, utilizando los dos oligonucleótidos especie-específicos y la combinación de los tres oligonucleótidos en la misma mezcla de reacción.

Adicionalmente, la especificidad de los oligonucleótidos fue confirmada mediante amplificación de ADN de diferentes bacterias patógenas involucradas en procesos diarreicos (*Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), *Blastocystis hominis*, *Entamoeba invadens* y ADN humano con los tres oligonucleótidos en una misma mezcla de reacción.

Aspectos éticos

Se cumplieron las normas éticas para investigación en salud vigentes en Colombia y fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia¹⁸.

Resultados

El estudio se efectuó entre julio de 2007 y abril de 2008, hasta alcanzar la meta proyectada de 100 muestras con diagnóstico de quistes del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* por microscopia de luz, realizada en la institución de origen. El total de muestra correspondió a 53 hombres y 47 mujeres; procedentes de Bogotá y de otros departamentos (Boyacá, Cauca, Huila, Meta, Putumayo y Tolima).

Se procedió a verificar el diagnóstico microscópico y se encontró que solamente 8/100 eran

positivas para quistes del complejo *E. histolytica* y *E. dispar*; también se visualizaron otros protozoarios y helmintos; además, 26% de las muestras tenían macrófagos (Tabla 1). Las 8 muestras con quistes fueron cultivadas en medio de Robinson, pero hubo aislamiento sólo en 6 casos y en los otras 2 no hubo progreso del cultivo. A partir de los cultivos con trofozoítos, se determinó la presencia de la Gal/GalNAc-lectina mediante ELISA y la amplificación específica de ADN genómico por PCR visibles en la electroforesis de agarosa, encontrándose sólo 1 cepa de *E. histolytica* y 5 cepas de *E. dispar* (Tabla 2, Figuras 1 y 2).

La utilización de los oligonucleótidos (EntaF/ERh) generó productos de 166 pb cuando se utilizó ADN de las cepas control HM1: ISS de *E. histolytica* como con los oligonucleótidos específicos (EntaF/ERd) para SAW 760 de *E. dispar*. Los productos generados fueron de 752 pb demostrando que la mezcla de oligonucleótidos no produce amplificación cruzada entre las especies del complejo. Resultados similares se observaron con la combinación de los tres oligonucleótidos (EntaF/ERh/ERd), en la misma mezcla de reacción usando ADN de las cepas control. En todas las combinaciones, fue posible observar intensidades similares de los fragmentos amplificados y no se observó amplificación cruzada al utilizar la mezcla

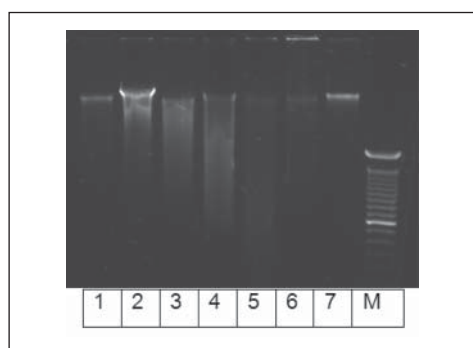
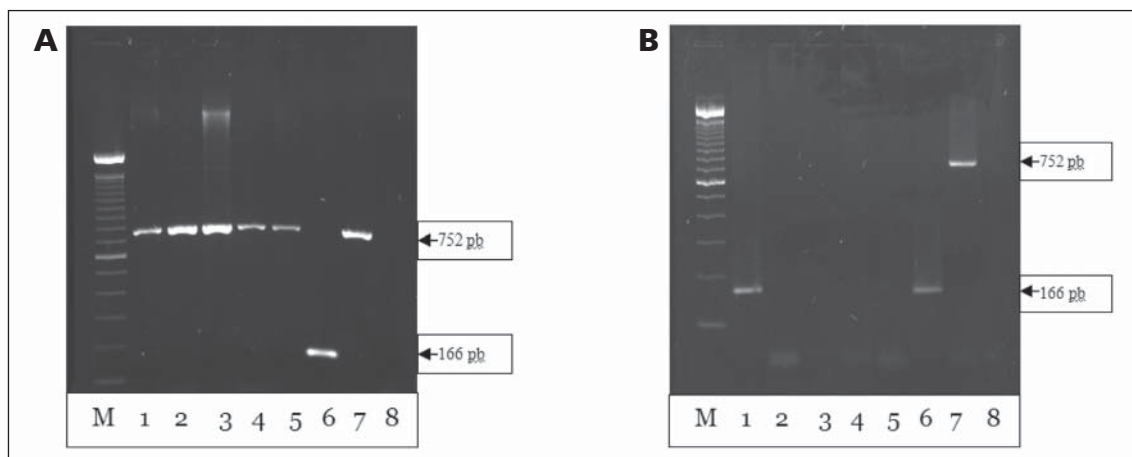
Tabla 1. Hallazgos en materia fecal por microscopia de luz en el centro de referencia

Agente	Frecuencia (%)	Intervalo de confianza IC 95%
<i>Entamoeba coli</i>	31/100 (31)	21,1 – 44
<i>Endolimax nana</i>	25/100 (25)	16,2 – 37
<i>Giardia duodenalis</i>	16/100 (16)	9,1 – 26
<i>Blastocystis hominis</i>	15/100 (15)	8,4 – 24,7
Complejo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	8/100 (8)	3,5 – 15,8
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	7/100 (7)	2,8 – 14,4
<i>Chilomastix mesnili</i>	5/100 (5)	1,6 – 11,7
<i>Entamoeba hartmanni</i>	4/100 (4)	1,1 – 10,2
<i>Áscaris lumbricoides</i>	1/100 (1)	0 – 0,6
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1/100 (1)	0 – 0,6
<i>Hymenolepis nana</i>	1/100 (1)	0 – 0,6

Tabla 2. Resultados en las muestras positivas para el complejo *E. histolytica/E. dispar*

Identificación de la muestra	Resultado microscópico (quistes)	Aislamiento en cultivo	Gal/GalNAc lectina específica (ELISA)	PCR	
				<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positiva	Positiva	Negativo
7	Positivo	Negativo	NA	NA	NA
8	Positivo	Negativo	NA	NA	NA

NA: no aplica.

**Figura 1.** Extracciones ADN genómico de aislamientos colombianos. Carril 1, ADN aislamiento 1 *E. dispar*; carril 2, ADN aislamiento 2 *E. dispar*; carril 3, ADN aislamiento 3 *E. dispar*; carril 4, ADN aislamiento 4 *E. dispar*; carril 5, ADN aislamiento 5 *E. dispar*; carril 6, ADN aislamiento colombiano *E. histolytica*; carril 7, ADN humano (control positivo de ADN genómico); M, marcador de peso molecular de 100 pb.**Figura 2. (A)** Especificidad de las reacciones con los oligonucleótidos EntaF/ERd y EntaF/ERh en la diferenciación de especies del complejo. M, marcador de peso molecular escalera de 100 pb; carril 1, ADN aislamiento 1 *E. dispar*; carril 2, ADN aislamiento 2 *E. dispar*; carril 3, ADN aislamiento 3 *E. dispar*; carril 4, ADN aislamiento 4 *E. dispar*; carril 5, ADN aislamiento 5 *E. dispar*; carril 6, ADN HM1: ISS (control positivo); carril 7, ADN *E. dispar* SAW 760 (control positivo); carril 8, agua (control negativo). **(B).** Especificidad de oligonucleótidos EntaF/ERd/ERh usando ADN de varios organismos. M, marcador de peso molecular, escalera de 100 pb; carril 1, ADN aislamiento colombiano *E. histolytica*; carril 2, ADN *Salmonella* sp; carril 3, ADN humano; carril 4, ADN *Blastocystis hominis*; carril 5, ADN *Entamoeba invadens*; carril 6, ADN *E. histolytica* HM1: ISS (control positivo); carril 7, ADN *E. dispar* SAW 760 (control positivo); carril 8, agua (control negativo).

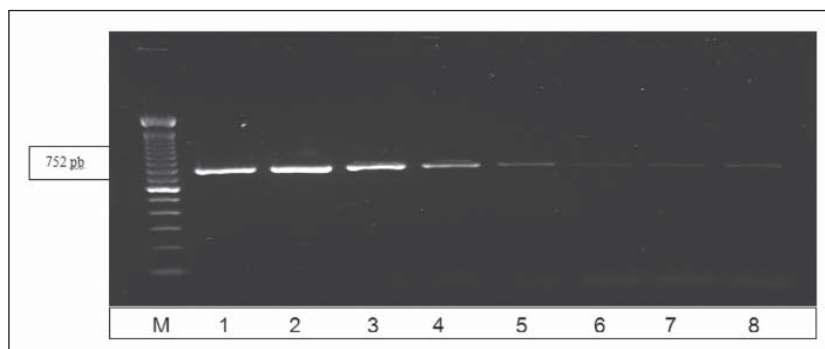


Figura 3. Sensibilidad de la reacción de PCR. Amplificación utilizando los oligonucleótidos EntaF/ERd y ADN control de *E. dispar* SAW760. M, marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1, dilución ADN 1:10¹; carril 2, dilución ADN 1:10²; carril 3, dilución ADN 1:10³; carril 4, dilución ADN 1:10⁴; carril 5, dilución ADN 1:10⁵; carril 6, dilución ADN 1:10⁶; carril 7, dilución ADN 1:10⁷; carril 8, dilución ADN 1:10⁸.

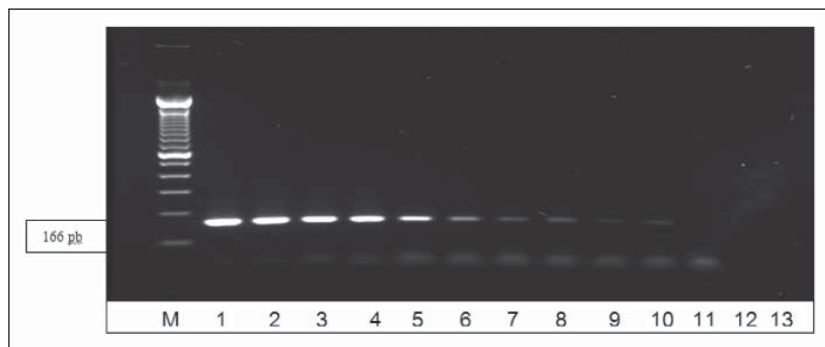


Figura 4. Sensibilidad de la reacción de PCR. Amplificación utilizando los oligonucleótidos EntaF/ERh y ADN control de *E. histolytica* HM1: ISS. M, marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1, dilución ADN 1:10¹; carril 2, dilución ADN 1:10²; carril 3, dilución ADN 1:10³; carril 4, dilución ADN 1:10⁴; carril 5, dilución ADN 1:10⁵; carril 6, dilución ADN 1:10⁶; carril 7, dilución ADN 1:10⁷; carril 8, dilución ADN 1:10⁸; carril 9, dilución ADN 1:10⁹; carril 10, dilución ADN 1:10¹⁰; carril 11, dilución ADN 1:10¹¹; carril 12, dilución 1:10¹²; carril 13, agua (control negativo).

de los tres oligonucleótidos en presencia de ADN humano, bacteriano y proveniente de otros parásitos intestinales (Figuras 2A y 2B).

La sensibilidad de la reacción de amplificación fue evaluada mediante diluciones seriadas 1:10 del ADN de los controles positivos *E. dispar* SAW 760 y *E. histolytica* HM1: ISS. Los resultados obtenidos muestran niveles de detección de hasta 0,04 pg de ADN de *E. dispar* y 0,01pg de ADN de *E. histolytica* (Figuras 3 y 4).

Discusión

El examen directo, por microscopía de luz con solución salina y lugol, ha sido de primera línea para la visualización tanto de trofozoítos como

quistes del complejo *E. histolytica/E. dispar*; sin embargo, se requiere de experiencia y entrenamiento del profesional. Además, existe dificultad para diferenciar al microscopio de luz entre un quiste y un leucocito o entre los quistes de otras amebas (*E. moshkovskii*, *E. coli* y *E. hartmanni*). El diagnóstico etiológico de la amebiasis intestinal no es posible con microscopía de luz debido a que las dos especies del complejo tienen características morfológicas idénticas y no se pueden distinguir la *E. histolytica* de la *E. dispar*, por tanto, se requiere de pruebas bioquímicas, inmunológicas y moleculares para confirmar la especie¹⁹⁻²¹.

En los pacientes con historia clínica sugestiva de patología invasiva por *E. histolytica* y evidencia de trofozoítos hematófagos, es necesario iniciar tratamiento empírico^{2,20}.

En este estudio, los hallazgos al microscopio de luz realizados en las instituciones de origen, fueron revisados en el centro de referencia; de las 100 muestras de materia fecal, sólo se verificó el hallazgo del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* en 8% y 92% restante eran falsos positivos; en cuanto al género, no se encontró diferencia significativa; se evidenció *E. hartmanni* en 4%, destacando que esta ameba puede diferenciarse del complejo sólo por el tamaño, por esta razón los quistes observados deben medirse. En este estudio, el sobrediagnóstico se explica por las limitaciones técnicas de la microscopía de luz con sensibilidad menor de 60% y especificidad entre 10 y 50% para determinar el complejo *E. histolytica*/*E. dispar*; lo anterior, lleva a un diagnóstico equivocado de amebiasis intestinal y prescripción innecesaria de antiamebianos de acción tisular, por lo que se recomienda al médico correlacionar las manifestaciones clínicas y los aspectos epidemiológicos con los resultados del coprológico³. De otra parte, el hallazgo de otros protozoarios y helmintos patógenos, está acorde con la prevalencia de parasitosis en países tropicales como Colombia⁸.

El cultivo no es una prueba de rutina para uso clínico, pero dada su alta especificidad, es prueba de oro para el aislamiento y así realizar las pruebas moleculares como PCR y la Gal/GalNac-lectina específica para la diferenciación de las especies del complejo^{3,16}.

En este estudio, la detección de Gal/GalNac-lectina específica mediante ELISA, mostró una frecuencia de 1% para *E. histolytica*, semejante a la prevalencia informada en Colombia, entre 0,6-1,4%^{9,10} y similar a la informada por Leiva et al en Nicaragua, de 1,5%¹², a diferencia de lo hallado en Venezuela y México sin tener una explicación evidente¹¹⁻¹³; sin embargo, la prevalencia encontrada en otras regiones del mundo es hasta 21%²²⁻²⁴.

Para *E. dispar*, la frecuencia en este estudio fue 5% en comparación a la prevalencia informada en Colombia en estudios previos (15-17%), análogo con otros estudios en Latinoamérica. No obstante, en otros lugares del mundo se ha encontrado hasta 24% de prevalencia para *E. dispar*^{9-13,22-24}.

Puesto que este trabajo no fue un estudio probabilístico, las frecuencias encontradas aportan información que debe ser cotejada con futuros estudios de prevalencia, con una selección aleatoria de la muestra. Por ahora, se puede inferir que estudios previos sin esta tecnología, informaban

frecuencias más altas de *E. histolytica* porque se incluía la *E. dispar*⁸.

Con el fin de evitar la presencia de inhibidores de la PCR presentes en la materia fecal, la extracción se realizó a partir de trofozoítos aislados en el cultivo. Se precisa que en otros estudios, se ha demostrado que la extracción manual, degrada parcialmente el ADN para la PCR. Por ello, se recomienda utilizar un *kit* de extracción para facilitar el proceso, independiente al tipo de muestra a analizar, incluso en materia fecal^{7,17,24-30}. Se adaptó una reacción de PCR que permite la diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, mediante la utilización de tres oligonucleótidos especie-específicos y no se observó amplificación cruzada al utilizar la mezcla de los tres oligonucleótidos, en presencia de ADN humano, bacteriano o proveniente de otros parásitos intestinales.

Los resultados obtenidos muestran que la PCR es capaz de detectar hasta 0,04 pg del ADN de *E. dispar* y 0,01 pg de ADN de *E. histolytica*, lo que demuestra que los oligonucleótidos son altamente sensibles para la diferenciación de las especies del complejo en ADN extraído de parásitos cultivados. En los ensayos de sensibilidad, se mantienen adecuados límites de detección, si se tiene en cuenta que el peso molecular de un genoma de *E. histolytica* por célula es de 0,02 pg. Según el límite de detección determinado en este estudio (0,01 pg), con los oligonucleótidos específicos para *E. histolytica*, sería posible amplificar ADN a partir de un trofozoito o quiste y con los oligonucleótidos para *E. dispar*, a partir de dos trofozoítos o quistes presentes en la muestra de interés^{7,17,24}.

El protocolo de extracción y amplificación y las concentraciones de reactivos utilizados para la mezcla de la PCR, deben ser ensayados con ADN extraído con *kit* a partir de trofozoítos congelados y criopreservados, muestras de materia fecal, biopsias y aspirado de absceso hepático amebiano con el fin de adaptar y estandarizar las condiciones en cada situación específica.

En resumen, estas dos técnicas son útiles para precisar la prevalencia real de *E. histolytica* en estudios epidemiológicos en Colombia, dado que en la actualidad hay sobre diagnóstico de infección amebiana por la imposibilidad de diferenciar las dos especies del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* y otras amebas en materia fecal^{16,31}; pero, la prueba Techlab *E. histolytica* II test® de segunda generación para Gal/GalNac-lectina específica,

empleada no está disponible en Colombia, por ser una prueba de alto costo para el Sistema General de Seguridad Social en Salud. Finalmente, el diagnóstico de la amebiasis se hace más complejo, sin las técnicas moleculares, para discernir como causante la *E. histolytica*, porque estudios recientes han informado la *E. moshkovskii* y está en estudio su patogenicidad y epidemiología^{32,33}.

Agradecimientos: A los Doctores: Graham Clark del London School of Hygiene and Tropical Medicine; Dan Eichinger de New York University; la Universidad Nacional de Colombia, División Investigación Sede Bogotá, código 5443 y los profesores Angélica Knudson, Hernando del Castillo y Daniel Velandia de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 340-4.
2. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico city, Mexico 28-29 January 1997. *Epidemiol Bull* 1997; 18: 13-4.
3. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 713-29.
4. Sargeant PG, Williams JE. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-21.
5. Haque R, Petri WA Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res* 2006; 37: 273-6.
6. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med* 2003; 348: 1565-73.
7. Verweij JJ, Blotkamp J, Brien E, Aguirre A, Polderman A. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using Polymerase Chain Reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 358-61.
8. Cáceres E, Castaño de Romero L, Estupiñán D, López MC, Páez S, Pinilla CA, et al. En: Corredor A, Arciniegas E, Hernández CA eds. *Parasitismo intestinal*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Bogotá: Instituto Nacional de Salud 2000; 67-8.
9. Guzmán C, López MC, Reyes P, Gómez J, Corredor A, Agudelo CA. Diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en muestras de materia fecal por detección de adhesina de *E. histolytica* mediante ELISA. *Biomédica* 2001; 21: 167-71.
10. Gallego M, Gómez JE, Torres E, Lora F. Prevalencia de *E. histolytica* en asentamientos temporales posterremoto de la ciudad de Armenia. *Infectio* 2003; 7: 190-4.
11. Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H. Epidemiologic and molecular study of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* strains in patients with diarrhea in Cumana, Sucre state, Venezuela. *Invest Clin* 2008; 49: 225-37.
12. Leiva B, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006; 37: 529-34.
13. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. *Exp Parasitol* 2005; 110: 327-30.
14. Robinson GL. The Laboratory Diagnosis of Human Parasitic Amoebae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 285-94.
15. Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, Lysterly D, et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3235-9.
16. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitshewinkoon-Petmir P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by single -round PCR assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3196-3200.
17. Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zárate L, Millan-Velasco F, Schoolmick G. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med and Hyg* 1993; 48: 58-70.
18. Ministerio de Salud. Dirección de desarrollo científico y tecnológico. Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Resolución No 008430 de 1.993. Santafé de Bogotá (Colombia): Imprenta Nacional; 1993.
19. López MC, Quiróz DA, Pinilla AE. Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal. *Acta Med Colomb* 2008; 33: 75-83.
20. WHO. Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 97-9.
21. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Re* 2007 ; 20: 511-32.
22. Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003; 361: 1025-34.
23. Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lysterly DM, Petri WA

- Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis* 1997; 175: 734-6.
24. Haque R, Ali IKM, Sack RB, Farr BM, Ramakrishnan G, Petri WA Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 2001; 183: 1787-93.
25. Verweij JJ, Oostvogel F, Brienen EAT, Nang-Beifubah A, Ziem J, Polderman AM. Short communication: Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. *Trop Med Int H* 2003; 8: 1153-6.
26. Visser LG, Verweij JJ, Esbroeck MV, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: Performance and clinical implications in a non-endemics setting. *Intern J Med Microbiol* 2006; 296: 397-403.
27. Furrows SJ, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1264-6.
28. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, et al. Comparison of stool antigen kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2258-61.
29. Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 237-41.
30. Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura NS, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol Diag* 1999; 4: 57-64.
31. Pinilla AE, López MC, Viasus DF. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev Med Chile* 2008; 136: 118-24.
32. Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 1154-60.
33. Nazemalhosseini Mojarad E, Nochi Z, Sahebkhari N, Rostami Nejad M, Dabiri H, Zali MR, et al. Discrimination of *Entamoeba moshkovskii* in patients with gastrointestinal disorders by single-round PCR. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 136-8.