



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Absceso hepático amebiano autóctono en España: ¿una enfermedad emergente? Descripción de 2 nuevos casos clínicos y de una técnica diagnóstica basada en la reacción en cadena de la polimerasa

M^a José Gutiérrez-Cisneros^{a,*}, Pablo Martín-Rabadán^b, Luís Menchén^c, Juan Manuel García-Lechuz^d, Isabel Fuentes^a, Teresa Gárate^a y Emilio Bouza^a

^a Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Madrid, España

^b Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Consulta del Viajero, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^c Servicio de Aparato Digestivo, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^d Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de marzo de 2008

Aceptado el 25 de junio de 2008

On-line el 8 de mayo de 2009

Palabras clave:

Amebiasis

Parasitosis emergente

Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

Introducción: En España se está detectando un aumento de la amebiasis en personas sin antecedentes de viajes o que no proceden de zonas endémicas.

Material y métodos: En este trabajo se presentan 2 nuevos casos de absceso hepático amebiano (AHA) autóctono y se revisan otros 21 casos de AHA descritos con anterioridad en España en pacientes que nunca habían salido de la Península Ibérica. Además, se describe una técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica*.

Resultados: Veinte casos (87%) se dieron en varones. La edad de los enfermos varió entre 26 y 77 años. Dos de las 3 mujeres con amebiasis extraintestinal tenían el virus de la inmunodeficiencia humana. En 17 individuos no se encontraron datos de exposición a los que se les pudiera atribuir el contagio de la infección. En los 6 restantes se registraron antecedentes de contacto directo con enfermos de amebiasis o con personas o alimentos sospechosos procedentes de zonas endémicas.

Discusión: La infección por *E. histolytica* se está convirtiendo en una infección emergente en el medio. La amebiasis debería considerarse en el diagnóstico diferencial de entidades clínicas compatibles, incluso en ausencia de antecedentes epidemiológicos de viajes o inmigración. Las nuevas técnicas diagnósticas moleculares pueden ayudar a caracterizar esta infección y deben considerarse métodos de referencia junto con las pruebas serológicas.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Autochthonous amebic liver abscess in Spain: An emerging disease? Case report and description of a PCR-based diagnostic test

ABSTRACT

Keywords:

Amebiasis

Emerging parasite

Polymerase chain reaction

Introduction: In Spain an increase in cases of amebiasis has been detected in patients with no history of traveling to, or immigration from, endemic areas.

Material and Methods: This study describes two new cases of amebic hepatic abscess due to native protozoa and reviews 21 more cases of amebic hepatic abscess reported in Spanish patients who had never left the Iberian Peninsula. In addition, a new PCR-based technique for diagnosing *Entamoeba histolytica* is described.

Results: Twenty cases (87%) occurred in men. The age range of the affected patients was 26 to 77 years. Two of the 3 women with extraintestinal amebiasis were HIV-positive. There was no history of exposure to the parasite in 17 cases. In the remaining 6 cases, direct contact with patients affected with amebiasis or with individuals or foods from endemic areas was recorded.

Conclusion: *Entamoeba histolytica* infection is becoming an emerging disease in our country. Amebiasis should be included in the differential diagnosis of consistent clinical entities even when there is no background of traveling or immigration. New molecular diagnostic tools can help to characterize this infection and should be considered reference techniques in combination with serological methods.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mjguti@isciii.es (M.J. Gutiérrez-Cisneros).

Introducción

La amebiasis es la infección por *Entamoeba histolytica*, un protozoo capaz de invadir la mucosa intestinal y diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado. Se estima que afecta en el mundo a aproximadamente 50 millones de personas y es causante de unas 100.000 muertes al año¹. En la mayoría de los países de Europa y América del Norte, esta parasitosis ha sido prácticamente erradicada tras las mejoras de las infraestructuras de aguas potables y residuales que se realizaron en el siglo pasado. En estos países, la mayor parte de los casos son importados, y afectan a viajeros e inmigrantes procedentes de zonas endémicas².

En los últimos años se ha detectado un aumento en el número de casos de absceso hepático amebiano (AHA) en pacientes que no han salido de España^{3–10}. En el año 2005 se publicó un estudio que recogió 10 de estos casos¹¹.

En este trabajo se describen 2 nuevos casos de AHA en pacientes que nunca habían salido de la Península Ibérica, se revisan los 21 casos descritos con anterioridad en España y se analiza su epidemiología así como las técnicas utilizadas en el diagnóstico microbiológico. Además, se describe una técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *E. histolytica*, puesta a punto en el Laboratorio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, que se emplea en el diagnóstico de la amebiasis extraintestinal.

Material y métodos

Revisión de la literatura médica y descripción de 2 nuevos casos de absceso hepático amebiano

Se realizó una revisión de la literatura médica mediante una búsqueda en MEDLINE (URL: www.pubmed.gov), para esto, se introdujeron las palabras clave: «absceso hepático», «amebiasis», «autóctono» y «España». Asimismo, se incluyeron los datos clínicos y microbiológicos de 2 nuevos casos de AHA, diagnosticados en el hospital Gregorio Marañón de Madrid en 2006 y 2007, en pacientes que nunca habían salido de la Península Ibérica.

Descripción de la técnica de diagnóstico molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa

La técnica molecular se utilizó en el diagnóstico de la amebiasis extraintestinal según el siguiente protocolo:

Extracción de ADN: la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la muestra obtenida por punción-aspiración del absceso hepático se realizó con un método comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. **Técnica de amplificación:** se utilizó una técnica de *nested* PCR (PCR anidada), que emplea como diana el gen *SSUrDNA* del parásito. En la primera reacción se usaron los iniciadores, descritos previamente por Evangeloupoulos¹², E1 (5'-TGC TGT GAT TAA AAC GCT-3') y E2 (5'-TTA ACT ATT TCA ATC TCG G-3'), que permiten amplificar un fragmento de 1.076 de pb. En la segunda amplificación, se emplearon unos iniciadores específicos para *E. histolytica*, Eh-1 (5'-ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A-3') y Eh-r (5'-CAG ATC TGA AAA CAA TGC TTC TCT-3') y se obtuvo un producto de amplificación de 427 pb. La primera PCR se llevó a cabo con 3 µl de ADN en un volumen final de 50 µl. La mezcla de la reacción incluyó tampón 10X de PCR (75 mM [pH 9.0] de trometamol, ácido clorhídrico, 50 mM de cloruro de potasio, 20 mM de sulfato de amonio, 20 mM de cloruro de magnesio), 200 µM de desoxinucleótido trifosfato, 12,5 pmol de cada iniciador y 1,25 U de *Thermus thermophilus* ADN polimerasa. Todos los

reactivos utilizados fueron adquiridos a Biotools (BIOTOOLS B&M Labs., S. A., España). Respecto a las condiciones de PCR, se realizó una preincubación a 94 °C seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, de anillamiento a 47 °C durante 30 s, y de extensión a 58 °C durante 30 s, se finalizó con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La segunda PCR se llevó a cabo con 5 µl del producto de la primera PCR y el resto de las condiciones son similares a las descritas para la primera reacción, excepto la temperatura de anillamiento, que fue de 60 °C. Los cebadores usados fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Londres, Reino Unido).

Los productos de PCR se visualizaron tras someterlos a electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X y tinción con bromuro de etidio. Para observar los amplicones se empleó un transiluminador, GEL Doc 2.000 (Bio-Rad), mediante el programa Quantity One 4.4.0 (Bio-Rad).

La sensibilidad de la PCR se determinó con ADN obtenido a partir del cultivo axénico de las cepas de *E. histolytica* HM-1: IMSS, cedido por cortesía del Dr. Graham Clark (The London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres, Inglaterra). El estudio de especificidad de la técnica se realizó con el ADN extraído de 15 abscesos hepáticos no amebianos.

Resultados

Descripción de los 2 nuevos casos de absceso hepático amebiano

Caso 1. Paciente de 35 años que acudió a urgencias por un cuadro de diarrea de 2 meses de evolución de hasta 20 deposiciones diarias blandas y sanguinolentas, fiebre, dolor en fosa ilíaca y pérdida de 5 kg de peso. Ni el paciente ni su familia habían viajado fuera de la Península Ibérica. Residía en zona urbana y negaba actividades sexuales u otros factores epidemiológicos de riesgo de gastroenteritis infecciosa. El enfermo presentaba al ingreso una temperatura de 38,8 °C, hepatomegalia discreta, leucocitosis y ligera alteración de las enzimas hepáticas. En la tomografía computarizada (TC) abdominal se observó engrosamiento de hasta 12 mm de la pared del íleon terminal y del colon ascendente, con líquido libre. En el segmento v1 del hígado se observó un absceso de 7 cm de diámetro. Al ingreso del paciente se sospechó enfermedad inflamatoria intestinal y absceso hepático secundario. Los coprocultivos y el examen de parásitos en heces fueron negativos. La detección de anticuerpos frente a *E. histolytica* se llevó a cabo mediante una técnica de hemaglutinación (Cellognost-Amebiasis, Dade Behring, Marburg, Alemania) y se obtuvo un título de 1/512. El segundo día de ingreso se drenó el absceso y su examen microscópico fue negativo. Se remitió una muestra del drenaje del absceso al Servicio de Parasitología para su análisis mediante la técnica de PCR (fig. 1). El paciente evolucionó favorablemente de los síntomas gastrointestinales y sistémicos al recibir tratamiento con metronidazol (750 mg cada 8 h durante 10 días), tratamiento que se completó con paromomicina (500 mg 3 veces al día durante una semana).

Caso 2. Varón de 51 años de edad que acudió a urgencias por presentar astenia, anorexia y dolor abdominal difuso, junto con náuseas y fiebre de 7 días de evolución sin alteración del tránsito gastrointestinal. El paciente estaba febril y sin alteraciones analíticas de interés. Se practicó una ecografía seguida de una TC abdominal y se detectaron múltiples lesiones hepáticas presentes, hipodensas y con alto componente necrótico (fig. 2), engrosamiento mural del colon ascendente con cambios inflamatorios de la grasa adyacente, y una formación endoluminal en polo cecal, de adenopatías en la región pericecal y el área ilíaca, todo esto indicativo de la sesión tumoral metastatizada. Se realizó una

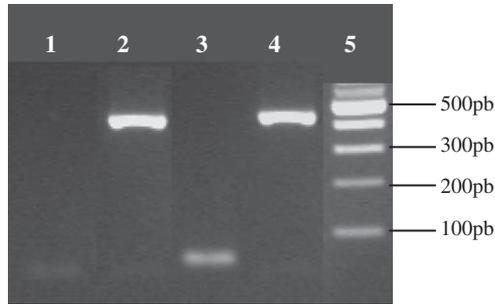


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de los amplificados de la reacción en cadena de la polimerasa anidada. Calle 1: muestra de un absceso no amebiano; calle 2: muestra del absceso del caso presentado; calle 3: control negativo; calle 4: control positivo de *Entamoeba histolytica*; calle 5: marcador de peso molecular.

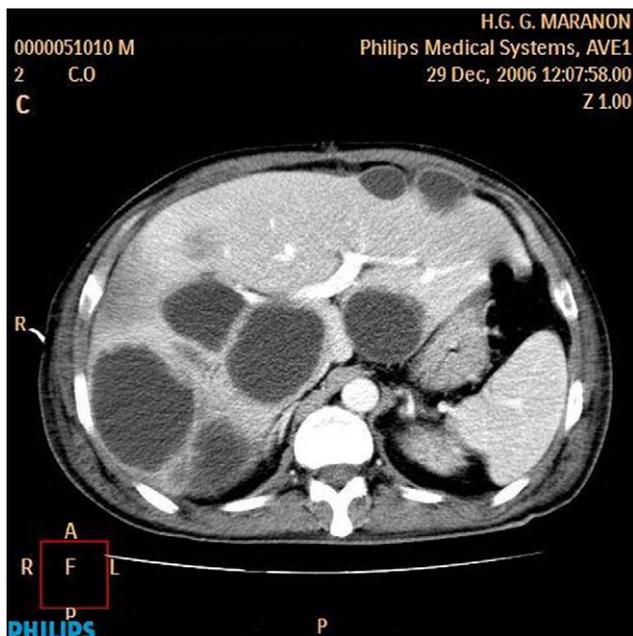


Figura 2. Imagen de scanner abdominal al ingreso en el que se aprecian abscesos hepáticos múltiples.

hemicolecotomía derecha, se realizaron biopsias de múltiples adenopatías y se extrajo el material purulento de las lesiones hepáticas que se envió para cultivo y examen histológico. En la pieza de colectomía se observaron trofozoitos y quistes de amebas con tinción de hematoxilina-eosina. En 3 ocasiones se realizaron punciones percutáneas de los abscesos hepáticos sin que se observasen microorganismos en las tinciones ni en los cultivos. La detección de anticuerpos frente a *E. histolytica* se realizó mediante una técnica de hemaglutinación (Cellognost-Amebiasis) y se obtuvo un título de 1/4096. Reevaluados los antecedentes epidemiológicos, el paciente negó haber viajado fuera de España. No obstante, hasta 6 semanas antes de su ingreso en el hospital, había estado en un centro penitenciario durante 3 años acompañado de una alta proporción de población extranjera y allí había mantenido relaciones con prostitutas africanas y sudamericanas; negó relaciones sexuales con varones. La evolución de la fiebre fue tórpida y persistió con picos intermitentes durante más de 35 días. Se trató la amebiasis con metronidazol en dosis de 750 mg cada 8 h y paromomicina en dosis de 500 mg 3 veces al día (ambos durante una semana), seguidas de cloroquina en dosis de 300 mg/día durante 5 semanas.

Revisión de la literatura médica

Con los casos descritos en el apartado precedente, se han reunido un total de 23 pacientes con AHA adquirido en España. Los datos epidemiológicos más destacados se muestran en la [tabla 1](#). Veinte casos (87%) se dieron en varones. La edad de los enfermos varió entre 26 y 77 años. Dos de las 3 mujeres con amebiasis extraintestinal tenían el virus de la inmunodeficiencia humana. En 17 individuos no se encontraron datos de exposición a los que se les pudiera atribuir el contagio de la amebiasis. En los 6 restantes se registraron antecedentes de contacto directo con enfermos de amebiasis o con personas o alimentos sospechosos procedentes de zonas endémicas.

Respecto a los métodos de diagnóstico microbiológico, en 19 casos la serología fue positiva, en 3 casos se observaron quistes de amebas en heces y en 6 enfermos (de los 13 en los que se investigó) se observaron trofozoitos de *E. histolytica* en el pus del absceso. Debe destacarse que en los 2 casos diagnosticados en 2007 se empleó la técnica molecular de PCR (descrita en el apartado anterior) a partir del material del absceso. En 2 de los enfermos no hay información sobre la técnica diagnóstica utilizada. En cuanto a la fecha de los casos, hay que resaltar que desde 1985 hasta 1997 se describieron 6 casos de AHA en españoles sin antecedentes de viaje a áreas endémicas: 4 en 1985, uno en 1991 y otro en 1995. En los últimos 10 años se han publicado 17 casos, y 9 de éstos en los últimos 4 años, lo que parece indicar un aumento en la prevalencia de esta infección.

Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

Los resultados obtenidos con la PCR anidada al analizar cantidades decrecientes de ADN de *E. histolytica* procedente de un cultivo axénico pusieron de manifiesto que la última dilución de ADN detectada fue la equivalente a 0,001 parásitos. En cuanto al estudio de especificidad, no se obtuvo producto de amplificación al analizar mediante PCR anidada las muestras de abscesos hepáticos no amebianos.

Discusión

Los casos comunicados y la revisión realizada obligan a incluir a la amebiasis entre las enfermedades potenciales de pacientes que nunca han salido de España, e indican un aumento reciente de esta entidad en el medio.

El fenómeno migratorio, y los intercambios comerciales son factores que pueden influir en la distribución global de determinados agentes infecciosos. Según el informe de 2007 de la Oficina Regional para la Inmigración de la Comunidad de Madrid (OFRIM), un 15,8% de la población empadronada en la Comunidad de Madrid es extranjera. De ésta, el 42,6% procede de Sudamérica y el 12,0% procede de África (áreas endémicas de infecciones, entre las que se encuentra la amebiasis). Muchos de estos inmigrantes trabajan en la horticultura intensiva (en ocasiones acomodados en infraviviendas), en la manipulación de alimentos, en la hostelería y en el servicio doméstico.

Si se tiene en cuenta lo anterior, resulta tentador asociar tanto el fenómeno migratorio como la importación de alimentos desde zonas endémicas a los casos autóctonos de amebiasis detectados en España en los últimos años. No obstante, tampoco debe descartarse que algunas de estas infecciones sean genuinamente autóctonas, dado que este parásito es cosmopolita y puede persistir en zonas con condiciones higiénicas deficientes. Es prudente prever que la amebiasis autóctona va a convertirse en una infección más frecuente de lo que ha sido hasta la fecha, ya

Tabla 1
Características de los casos de absceso hepático amebiano autóctonos descritos en España

Año (referencia)	Sexo/edad en años	Antecedentes epidemiológicos	Serología	Observación en heces	Observación en el pus del absceso
1985(11)	V/30	No	HAI 1/1.280	No	NR
1985(11)	V/69	No	NR	No	Sí
1985(11)	V	Sí ^a	–	–	–
1985(11)	V/50	No	HAI +	No	No
1991(11)	V/31	Sí ^b	IFI 1/4.100	Sí	Sí
1995(11)	V	Sí ^c	–	–	–
1997(5)	M/(28–58)	No	HAI 1/2.048	Sí	NR
1999(11)	V/26	No	IFI 1/1.100	No	–
1999(5)	V/(28–58)	No	HAI 1/2.048	No	NR
2000(10)	V/36	No	ELISA Positivo	–	No
2000(11)	V/77	No	HAI 1/1.280	No	Sí
2001(5)	M/(28–58)	No	HAI 1/512	Sí	Sí
2001(5)	V/(28–58)	No	HAI 1/2.048	No	NR
2002(9)	V/72	No	IFI 1/100	No	Sí
2004(11)	V/54	No	HAI 1/2.560	No	NR
2004(6)	V(48)	No	AL Negativo	No	Sí
2004(7)	V(38)	Sí ^d	HAI Positivo	No	NR
2004(8)	V(54)	No	HAI 1/2.560	No	No
2005(11)	V/48	Sí ^e	IFI 1/640	No	NR
2005(3)	V(69)	No	IFI 1/1.024	No	No
2007(4)	M(61)	No	ELISA 2,02	No	No
2006	V (51)	Sí ^c	HAI 1/4096	No	No
2007	V (35)	No	HAI 1/512	No	No

AL: aglutinación con látex; ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción; HAI: hemaglutinación indirecta; IFI: inmunofluorescencia indirecta; M: mujer; NR: no realizado; V: varón; –: sin datos.

^a Relaciones sexuales con varón sudamericano.

^b Convivencia con enfermo de amebiasis.

^c Comerciante de frutas tropicales.

^d Convivencia con sudamericana.

^e Sexo con prostitutas sudamericanas y africanas.

que los fenómenos migratorios y el comercio a escala global no dejan de crecer.

En muchas ocasiones, la amebiasis intestinal es una infección asintomática, que pasa desapercibida en población inmigrante, lo que permite que aumente la circulación del parásito en el medio y, por tanto, la probabilidad de contagio. Ante esta nueva perspectiva, los procedimientos diagnósticos que se usan para detectar la amebiasis en España deberían ser reconsiderados. En primer lugar, debe incluirse en el diagnóstico diferencial de cuadros clínicos compatibles. En cuanto al diagnóstico microbiológico, es necesario utilizar herramientas que permitan identificar con fiabilidad las infecciones importadas que, hasta hace unos años, eran poco comunes en España. Para la detección del AHA en el laboratorio, la microscopía es una técnica de baja sensibilidad¹³. Sin embargo, las técnicas de PCR (como la descrita en este trabajo) tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de esta parasitosis. La sensibilidad de la técnica de PCR para la amplificación del ADN de *E. histolytica* a partir de la muestra obtenida por punción-aspiración del absceso hepático es cercana al 100%^{14,15}. También se han utilizado otras muestras, como sangre, orina y heces, aunque con una sensibilidad muy inferior¹⁶. Las técnicas serológicas presentan una sensibilidad y especificidad aceptables, pero hay que destacar que en inmigrantes de zonas endémicas de amebiasis, el resultado de la serología no tiene valor diagnóstico, ya que los anticuerpos pueden persistir durante años tras una infección. Por tanto, en el caso de emplear una técnica serológica, el diagnóstico debe confirmarse por otro método (como los basados en la PCR), especialmente en la población que ha residido largos períodos de tiempo en zonas endémicas. Otro inconveniente de la serología son los falsos negativos debidos a la existencia de un período ventana en las primeras etapas de la enfermedad^{17,18}.

Para concluir, la infección por *E. histolytica* está aumentando en prevalencia en los últimos años. Debería tenerse presente desde el

punto de vista clínico y microbiológico en entidades compatibles, incluso en ausencia de antecedentes epidemiológicos de posible contacto con el parásito. Las técnicas basadas en la biología molecular, disponibles en centros de referencia, presentan mayor fiabilidad que los métodos microscópicos de diagnóstico, por lo que se recomienda su uso en el diagnóstico de la amebiasis en España^{19,20}.

Bibliografía

- Anonymous. Informe de la OMS/OPS/UNESCO. Consulta con expertos en amebiasis. Boletín Epidemiológico. OPS. 18, 13–14. 2007.
- Stanley Jr SL. Amoebiasis. Lancet. 2003;361(9362):1025–34.
- Antón E. An elderly man with multiple hepatic lesions: Other concepts on amebic liver abscess. J Am Geriatr Soc. 2005;53(6):1082.
- Gutiérrez-Cisneros MJ, Sineiro PE, Garate OT, Fuentes CI. Absceso hepático amebiano autóctono: diagnóstico microbiológico por PCR. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25(7):493–4.
- Ruiz DG, Serra T, Leyes M, Delibes C, Salva F, Pérez JL. Absceso hepático amebiano: observaciones sobre siete pacientes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22(9):526–8.
- Sánchez-Pobre P, Sáenz-López S, Salto E, Sanjuán R, Ibero C, Masedo A, et al. Absceso hepático amebiano sobreinfectado sin antecedentes epidemiológicos. Rev Esp Enferm Dig. 2004;96(11):796–800.
- Giner Galván V, Fernández Rodríguez C, Esteban Giner MJ, Ruano Camps M. Amebiasis autóctona española. ¿Enfermedad emergente o endémica? Med Clin (Barc). 2004;123(16):636–7.
- Martín EA, González QS, Duenas GC, Grande SC. Absceso hepático amebiano autóctono. Presentación de un caso. Rev Clin Esp. 2004;204(1):43–4.
- Garré C, Morán S, Albaladejo A, García J, Mercader J. Absceso amebiano hepático I. Rev Esp Enferm Dig. 2002;94(9):564–5.
- Lomas Cabezas JM, Alcoucer DR, Saavedra MJ, Pujol dL. Infestación humana por *Entamoeba histolytica*. ¿Una enfermedad autóctona en nuestro medio? A propósito de un caso. Rev Clin Esp. 2000;200(7):399.
- Díaz-González E, Manzanedo-Terán B, López-Vélez R, Dronza F. Absceso hepático amebiano autóctono: caso clínico y revisión de la literatura médica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23(3):179–81.
- Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol. 2000;94(3):233–40.

13. Tachibana H, Kobayashi S, Okuzawa E, Masuda G. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. *Int J Parasitol.* 1992;22(8):1193–6.
14. Khan U, Mirdha BR, Samantaray JC, Sharma MP. Detection of *Entamoeba histolytica* using polymerase chain reaction in pus samples from amebic liver abscess. *Indian J Gastroenterol.* 2006;25(2):55–7.
15. Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng I, Mirelman D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):3034–6.
16. Parija SC, Khairnar K. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiol.* 2007;7:41.
17. Van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Peek R, Wetsteyn JC, et al. Use of rapid dipstick and latex agglutination tests and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amebic liver abscess, amebic Colitis, and *Entamoeba histolytica* Cyst Passage. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4801–6.
18. Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(4):727–32.
19. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2405–7.
20. 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(1):237–41.