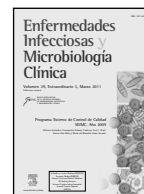




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Amebas intestinales no patógenas: una visión clinicoanalítica

Bárbara Gomila Sard^a, Rafael Toledo Navarro^b y J. Guillermo Esteban Sanchis^{b,*}

^aServicio de Microbiología, Hospital General de Castellón, Castellón, España

^bDepartamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Burjassot, Valencia, España

Palabras clave:

Entamoeba
Endolimax
Iodamoeba
Amebas no patógenas
Morfología
Epidemiología
Diagnóstico
Terapéutica
Profilaxis

RESUMEN

El ser humano puede ser parasitado por diferentes especies de amebas intestinales. *Entamoeba histolytica* es la única de reconocido poder patógeno, mientras que las restantes, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* y *Iodamoeba buetschlii*, se consideran no patógenas. El objetivo de esta revisión es sintetizar las características morfológicas fundamentales de los estadios de trofozoito y de quiste de cada una de ellas como base primordial para llevar a cabo un diagnóstico microscópico preciso. La dificultad que conlleva la diferenciación morfológica entre las especies englobadas en el denominado "complejo *Entamoeba*" obliga al uso de métodos diagnósticos inmunológicos y moleculares. También se lleva a cabo una síntesis de los aspectos epidemiológicos e incluso terapéuticos y profilácticos básicos de este grupo de amebas no patógenas. Todo ello resulta relevante porque estas amebas se encuentran presentes habitualmente en las analíticas coproparasitológicas humanas y deben ser diferenciadas de la especie patógena, *E. histolytica*. Además, se pueden utilizar como adecuados marcadores biológicos del grado de saneamiento ambiental y de las medidas higienicosanitarias de la población.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Keywords:

Entamoeba
Endolimax
Iodamoeba
Non-pathogenic amoebae
Morphology
Epidemiology
Diagnosis
Treatment
Prophylaxis

Non-pathogenic intestinal amoebae: a clinical-analytical overview

ABSTRACT

Human beings can be parasitized by various species of intestinal amoebae. *Entamoeba histolytica* is the only intestinal amoeba recognized to be pathogenic, while other amoeba species, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* and *Iodamoeba buetschlii* are considered to be non-pathogenic. The aim of this review is to synthesize the main morphological characteristics of the trophozoite and cyst stages of each amoeba as the basis for precise microscopical diagnosis. The difficulty of morphological differentiation among species included in the so-called "*Entamoeba* complex" entails the use of immunological and molecular diagnoses. In addition, a summary of basic epidemiological, therapeutic and prophylactic aspects of these non-pathogenic amoebae is provided. All of these aspects are crucial since these amoebae are usually found to be present in human coproparasitological analyses and must be differentiated from the pathogenic species *E. histolytica*. Furthermore, they can be used as suitable biological tags of the hygienic state of the environment and the health and hygiene measures of the population.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

En la rutina coproparasitológica, el término "ameba" engloba las especies pertenecientes a los géneros *Entamoeba*, *Endolimax* y *Iodamoeba*. Según la clasificación que se considere, estas amebas son incluidas bien en el orden Amoebida¹ bien en el orden Entamoebida², pero siempre dentro de la familia Entamoebidae. En esta familia destaca *Entamoeba histolytica*, única ameba intestinal de reconocido po-

der patógeno al ser responsable de la disentería amebiana, enfermedad que afecta a 40-50 millones de personas al año y que supone alrededor de 100.000 muertes anuales³. Las restantes especies de amebas intestinales, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* y *Iodamoeba buetschlii*, se consideran no patógenas. Además, en detritus de la boca que contaminan el esputo se pueden encontrar trofozoítos de *E. gingivalis*, especie frecuente en raspado de tejidos de la encía, en especial en casos de enfermedad

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Jguillermo.Esteban@uv.es (J.G. Esteban Sanchis).

periodontal alveolar, aunque de forma puntual también se han hallado en frotis vaginales o cervicales de mujeres que usaban dispositivos intrauterinos⁴.

El reconocimiento de las amebas intestinales no patógenas resulta relevante porque: a) se encuentran presentes habitualmente en las analíticas coproparasitológicas humanas; b) es necesario establecer su diferenciación respecto de la especie patógena, *E. histolytica*, y c) se pueden utilizar como adecuados marcadores biológicos del grado de saneamiento ambiental y de las medidas higienicosanitarias de la población.

Consideraciones morfológicas

La identificación de las amebas intestinales no patógenas se basa en reconocer sus estadios de trofozoito, de quiste o de ambos⁵⁻⁹. Los trofozoitos presentan una membrana delgada y tamaños y formas diversos, mientras que los quistes, de pared lisa y uniforme, son esféricos, subsféricos o alargados, con poca variabilidad de tamaño.

Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii

A pesar de la controversia inicial sobre la validez de *E. dispar* como especie diferente de *E. histolytica*, los estudios bioquímicos, inmunológicos y genéticos han hecho que formalmente sean aceptadas como especies diferentes¹⁰. Sin embargo, la imposibilidad de poder establecer la diferenciación morfológica al microscopio entre ambas especies ha motivado que analíticamente ambas se engloben bajo el binomio "complejo *Entamoeba*". Más recientemente, se ha incorporado a dicho complejo otra especie, *E. moshkovskii*, cuyos primeros aislamientos fueron en aguas residuales en diferentes países, pero que en los últimos años se ha informado de su presencia en heces humanas¹¹. Estudios moleculares han confirmado que la conocida otrora como "*E. histolytica* variedad Laredo", detectada en las heces de un individuo de Laredo (Texas), es en realidad una variedad de *E. moshkovskii*¹².

De esta forma, el "complejo *Entamoeba*" vendría a englobar las especies *E. histolytica*, de reconocida patogenicidad, y *E. dispar* y *E. moshkovskii*, consideradas como no patógenas.

Trofozoíto. Este estadio suele presentar un tamaño de entre 10 y 60 μm , aunque el rango habitual suele ser de 15 a 20 μm . En fresco presenta una movilidad progresiva, algunas veces explosiva, mediante pseudópodos de morfología variable que evidencian la diferenciación entre el ectoplasma hialino y el endoplasma granular. El núcleo, de 3-5 μm de diámetro, no se aprecia en preparaciones sin teñir. El uso de tinciones permite observar un cariosoma pequeño, compacto y casi siempre de localización central, si bien puede ser excéntrico (fig. 1A). La cromatina perinuclear está constituida por finos gránulos, por lo general de distribución y tamaño uniformes, aunque en ocasiones su depósito puede ser irregular. El citoplasma presenta un aspecto granular y una vacuolización considerable cuando se demora la preservación de la muestra. Además, es muy frecuente la presencia de bacterias, pero no de glóbulos rojos. Precisamente, la presencia de éstos en el citoplasma se puede considerar diagnóstico de *E. histolytica*.

Quiste. Cuando los trofozoitos van a transformarse en formas quísticas expulsan todo el material ingerido y se redondean. Estas formas prequísticas pueden reconocerse por la presencia de un único núcleo redondeado, la ausencia de materiales fagocitados y la ausencia de pared quística. Sin embargo, la morfología nuclear es algo confusa, por lo que no son muy adecuados para el diagnóstico. Los quistes, en cambio, son generalmente esféricos y el tamaño oscila entre 10 y 20 μm , siendo el rango habitual de 12 a 15 μm . Los quistes maduros o infectantes presentan 4 núcleos (fig. 1J), mientras que en los inmaduros se puede observar 1 o 2 (fig. 1I). Estos núcleos no son fá-

cilmente visibles sin teñir. Con tinción, la estructuración nuclear es prácticamente idéntica a la del trofozoito, excepto por su pequeño tamaño, aunque en ocasiones los carisomas son excéntricos y la cromatina perinuclear se dispone en finas láminas o en forma semilunar. Suele ser frecuente la presencia de cuerpos cromatoides, cromatoidales o de reserva bajo la forma de barras alargadas de extremos romos, siendo más frecuente su aparición en los quistes uni y binucleados (fig. 1I). En estos quistes jóvenes también se observa una masa glucogénica concentrada, de color pardo rojizo con solución yodada, mientras que en los quistes maduros dicho glucógeno suele presentarse difuso.

Entamoeba hartmanni

Otrora conocida como "raza pequeña" de *E. histolytica*, hoy en día nadie discute su identidad como especie¹³. La confusión entre ésta y las especies incluidas en el "complejo *Entamoeba*" se basa en sus similitudes morfológicas, siendo el tamaño la única diferencia manifiesta.

Trofozoíto. Este estadio presenta forma redondeada o ameboide y tamaño de 5 a 12 μm , con promedio de 8 a 10 μm . El movimiento, por lo general, no es progresivo y su único núcleo no es visible en preparaciones sin teñir. En preparaciones teñidas, y aunque lo hace débilmente, se observa un cariosoma pequeño, compacto y de localización central, pero en ocasiones puede ser excéntrico. Generalmente contiene cromatina perinuclear en forma de finos gránulos de tamaño y distribución uniformes, pero a veces puede presentar aspecto finamente arrosariado (fig. 1F). El citoplasma es finamente granular, pudiendo contener habitualmente bacterias, pero nunca glóbulos rojos, al ser incapaz de ingerirlos.

Quiste. Es generalmente esférico y el tamaño oscila de 5 a 10 μm , aunque más frecuentemente entre 6 y 8 μm . Los quistes maduros tienen 4 núcleos, no visibles en preparaciones en fresco sin teñir, pero sí con tinción de Lugol. Los quistes inmaduros, con 1 o 2 núcleos, son más frecuentes que los quistes maduros. En preparaciones teñidas, los núcleos presentan un cariosoma central pequeño y cromatina perinuclear distribuida regularmente con gránulos finos uniformes (fig. 1E). Al igual que sucede en el resto de especies del "complejo *Entamoeba*", el glucógeno puede ser difuso en los quistes maduros, pero en los quistes inmaduros es más concentrado. Los cuerpos cromatoidales pueden tener forma de racimo o ser alargados con extremos redondeados.

Entamoeba coli

Se trata de la ameba intestinal no patógena que, posiblemente, menos dificultades de reconocimiento morfológico presenta, sobre todo bajo la forma de quiste maduro.

Trofozoíto. Este estadio mide entre 15 y 50 μm , aunque el tamaño habitual es de 20 a 25 μm . Este estadio, en fresco, presenta poca movilidad y sin marcada direccionalidad, emitiendo pseudópodos romos y cortos, no hialinos, y sin evidenciar una marcada diferenciación ecto y endoplasmática. Con frecuencia, el núcleo es visible en preparaciones sin teñir. Cuando se somete a tinción se observa un cariosoma irregular, no compacto, de gran tamaño, a menudo de localización excéntrica y rodeado por un halo de material sin teñir. La cromatina perinuclear tiene forma de gránulos gruesos, de tamaño y distribución irregulares (fig. 1G). No obstante, algunos trofozoitos pueden presentar núcleos con cariosoma central y cromatina periférica uniforme. A veces se observan gránulos de cromatina dispersos entre el cariosoma y la cromatina perinuclear, formando una estructura radial. Por lo general, el citoplasma es granular y muy vacuolado, pudiendo contener bacterias, levaduras y otros detritos, siendo habi-

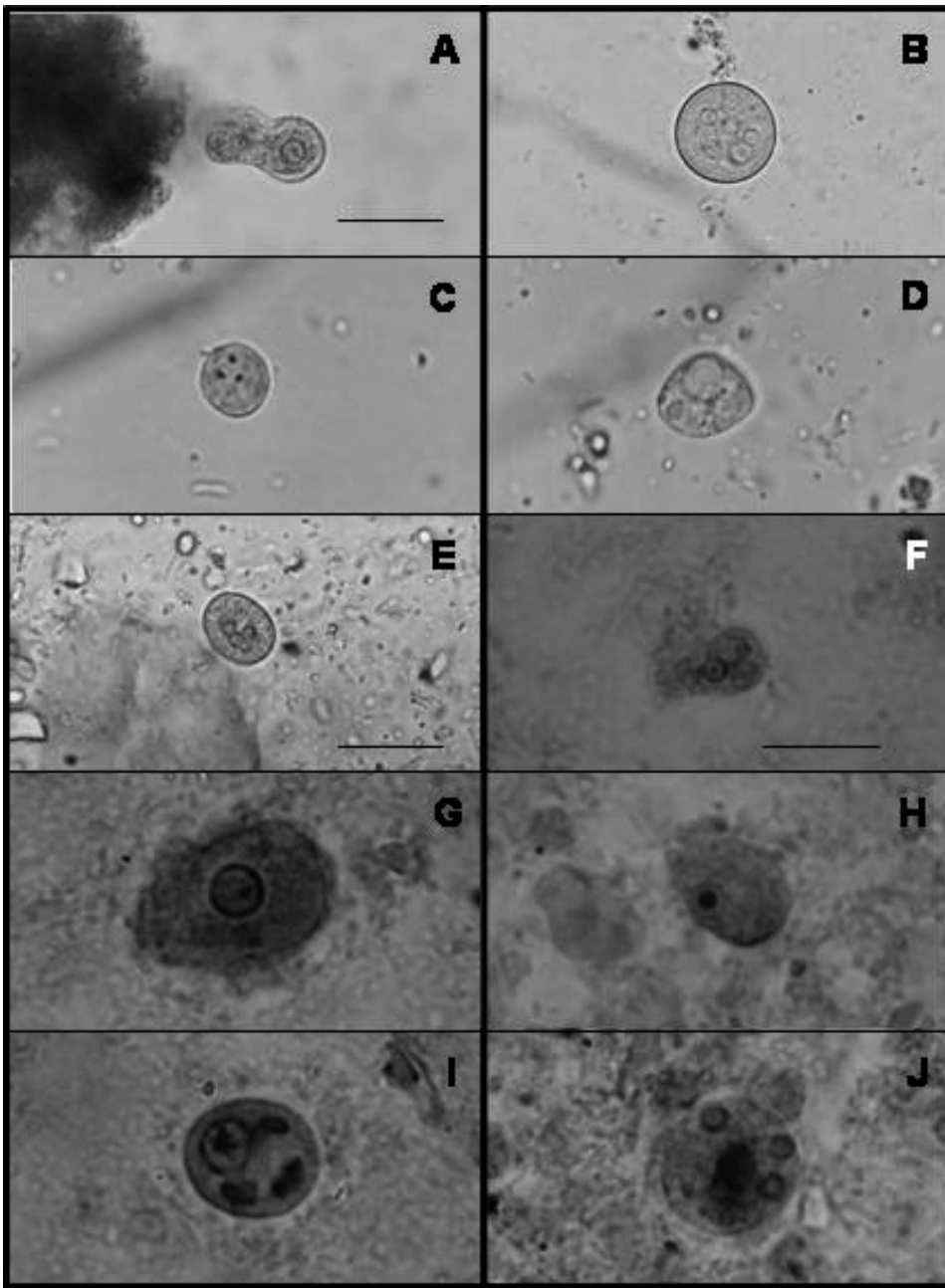


Figura 1. Fotocomposición de imágenes microscópicas de trofozoítos (A, F, G y H) y quistes (B, C, D, E, I y J) de amebas intestinales. A-D) Trofozoítos del “complejo *Entamoeba*” (A) y quistes de *Entamoeba coli* (B), *Endolimax nana* (C) e *Iodamoeba buetschlii* (D) teñidos con solución iodada (1.000×). E) Quiste de *Entamoeba hartmanni* teñido con MIF (1.250×). F-J) Trofozoítos de *E. hartmanni* (F), *E. coli* (G), e *I. buetschlii* (H), y quistes inmaduro (I) y maduro (J) del “complejo *Entamoeba*” teñidos con tricrómico de Wheatley en frotis elaborados a partir de muestras fecales fijadas en APV (1.000×). (Escala: A-D, 15 µm; E, 10 µm; F-J, 10 µm.)

tual la presencia de esporas diminutas del hongo *Sphaerita*. Excepto en raras ocasiones, el citoplasma no contiene glóbulos rojos.

Quiste. Al igual que en el resto de especies del “complejo *Entamoeba*”, también se observan formas prequísticas de difícil adscripción específica. Los quistes miden de 10 a 35 µm, aunque su tamaño habitual es de 15 a 25 µm. En su mayor parte son esféricos, pero pueden ser ovales y la pared quística es muy refráctil. Los quistes maduros suelen tener 8 núcleos (fig. 1B), siendo muy poco frecuentes los quistes hipernucleados, con 16 o más núcleos. Los núcleos y la posición excéntrica de los cariosomas son observables, por lo general, en los quistes sin teñir, aunque para observar los cariosomas es preferible fijarse en los quistes inmaduros mono o binucleados, en los que su tamaño es mayor. En tinciones permanentes se observan los detalles de la estructura nuclear, aunque no se encuentran tan bien definidas como en los trofozoítos. El cariosoma puede ser compacto o difuso, de localización central o excéntrica. La cromatina periférica varía de gránulos gruesos e irregulares a un aspecto más uniforme que el ob-

servado en los trofozoítos. El citoplasma de los quistes inmaduros contiene una gran masa de glucógeno con los núcleos desplazados hacia los lados del quiste, mientras que el de los maduros presenta aspecto granular, pudiendo contener glucógeno difuso. Los cuerpos cromatoidales suelen tener forma de astilla y más raramente acintada o filiforme, con los extremos irregulares.

Entamoeba polecki

Aunque no hay consenso acerca de la adjudicación de especie en las *Entamoeba* productoras de quistes maduros con un solo núcleo capaces de infectar al ser humano, ya que se ha demostrado hasta la fecha la existencia de 4 genotipos, los últimos estudios coinciden en denominarlos como “*E. polecki-like*”^{13,14}.

Trofozoíto. Se trata de un estadio esférico de 10 a 25 µm, con un tamaño promedio de entre 12 y 18 µm. Se puede observar algunos seudópodos romos, claros o finamente granulares de formación len-

ta, rara vez explosivos, y sin apenas movilidad direccional. El núcleo se presenta muchas veces distorsionado o de forma irregular, no siendo visible frecuentemente sin teñir. El cariosoma es por lo general visible, diminuto y de localización central. La cromatina periférica se observa generalmente como pequeños gránulos dispuestos regularmente sobre la cara interna de la membrana nuclear, aunque en ocasiones puede ser moderadamente gruesa y de distribución irregular, e incluso acumularse en 1 o los 2 polos. El citoplasma se observa a menudo vacuolado y con bordes hialinos, pudiendo contener bacterias y levaduras ingeridas. Todo ello hace que este estadio presente características que lo acercan a las especies del "complejo *Entamoeba*" y a *E. coli*.

Quiste. El tamaño varía entre 9 y 24 μm , aunque la mayoría mide de 9 a 15 μm . Es característico de esta especie la presencia de un solo núcleo, aunque cabe observar en ocasiones algún quiste binucleado. El núcleo suele ocupar menos de un tercio del diámetro del quiste. El cariosoma puede ser pequeño, grande y compacto, o grande y difuso. Además, su posición puede ser central o excéntrica. La cromatina muestra una distribución uniforme sobre la membrana nuclear. El material cromatoideo es abundante y sumamente variable, ya que puede aparecer como partículas pequeñas esféricas o como bastones grandes y pequeños, con extremos redondeados o irregulares, si bien no suele aparecer cuando el quiste contiene una gran masa de inclusión, cuya naturaleza no parece ser glucogénica. Esta masa de inclusión es de tamaño variable y adquiere un color pardo claro, distinto del color oscuro de las vacuolas de glucógeno, cuando se tiñe con solución yodada, y de color gris púrpura o verde con la tinción tricrómica.

Endolimax nana

Se trata de una de las amebas intestinales más pequeña que parasita al ser humano.

Trofozoíto. Este estadio mide de 6 a 12 μm , con un promedio de 8 a 10 μm . El movimiento lento y sin direccionalidad se lleva a cabo por pseudópodos cortos, romos y hialinos. El núcleo a veces es visible en preparaciones sin teñir y con tinción se aprecia la estructura nuclear típica, siendo lo más destacado el cariosoma grande e irregular, en ocasiones fragmentado, o desplazado hacia un lado de la membrana nuclear. Es característica la no observación de cromatina perinuclear. El citoplasma presenta un aspecto granular y muy vacuolado, pudiendo contener bacterias incluidas en vacuolas alimenticias.

Quiste. Mide de 5 a 10 μm , con un rango habitual de 6 a 8 μm , y su forma varía de esférica a elíptica. Los quistes maduros contienen 4 núcleos, siendo poco frecuente observar formas hipernucleadas (con hasta 8 núcleos) y quistes inmaduros. Los núcleos no son visibles en preparaciones sin teñir, pero los cariosomas son observables en preparaciones en fresco teñidas con yodo (fig. 1C). En preparaciones permanentes, el núcleo tiene un cariosoma bien definido, más grande que el de las especies de *Entamoeba*, normalmente en posición excéntrica y sin cromatina periférica. El citoplasma carece de cuerpos cromatoidales aunque puede contener glucógeno difuso y, en ocasiones, cabe observar pequeños gránulos o inclusiones.

Iodamoeba buetschlii

Recibe su nombre genérico de la característica masa de glucógeno presente en su forma quística.

Trofozoíto. Este estadio mide de 8 a 20 μm , con un promedio de 12-15 μm . Su movimiento es lento y no progresivo, mediante pseudópodos hialinos. El núcleo no resulta visible en preparaciones sin teñir. La membrana nuclear es muy fina al carecer de cromatina peri-

férica, lo que da al cariosoma el aspecto de estar contenido en una vacuola. Cuando se tiñe, el cariosoma es grande, redondo, situado en una posición más o menos central, y envuelto por una capa de pequeños gránulos acromáticos refringentes (fig. 1H). En ocasiones, estos gránulos están adheridos al cariosoma, en cuyo caso no serán visibles, a no ser que la tinción y la diferenciación se hayan llevado a cabo en condiciones óptimas. En caso contrario, estos pequeños gránulos de cromatina formarán un anillo entre el cariosoma y la membrana nuclear. El citoplasma es granular, vacuolado y puede contener bacterias, levaduras u otros detritus, pero nunca glóbulos rojos.

Quiste. El diámetro varía de 5 a 20 μm , aunque la mayoría está en el rango de 10 a 12 μm . Su morfología es variable, desde esférica hasta elíptica. Los quistes maduros tienen un solo núcleo, no visible en preparaciones sin teñir. Con tinciones permanentes, el núcleo contiene un cariosoma grande, por lo general excéntrico y pueden ser visibles o no gránulos acromáticos alrededor del cariosoma o a un lado de éste formando un agregado semilunar. Lo más destacado del quiste es la presencia de una masa de glucógeno compacta en el citoplasma, bien visible aun en el quiste sin teñir, debido a su refractilidad, y que ocupa más de la mitad del volumen del quiste. La tinción con yodo puede no teñirla en algunas ocasiones (fig. 1D), mientras que en otras le hace tomar un color pardo rojizo. Las tinciones permanentes no la tiñen, aunque aparece como una masa bien definida.

Consideraciones epidemiológicas

Este grupo de amebas intestinales comparte una serie de características epidemiológicas como es el presentar la mayoría de ellas una distribución cosmopolita o la de poseer idéntico mecanismo de transmisión, siempre ligado a la ingestión de los quistes maduros o infecciosos a través de una transmisión fecal-oral.

La prevalencia real de este grupo de amebas no es siempre conocida, en unos casos debido al grado de pericia del analista a la hora de establecer el diagnóstico concreto y en otros por no informarse al no ser consideradas patógenas.

La epidemiología de las especies integrantes del "complejo *Entamoeba*" permanece incierta debido a que la mayoría de los datos existentes se ha obtenido a través de métodos incapaces de distinguir morfológicamente las 3 especies, *E. histolytica*-*E. dispar*-*E. moshkovskii*. De hecho, recientes estudios moleculares vienen a indicar que *E. dispar* es 10 veces más frecuente que *E. histolytica*¹⁵, siendo la causa del 90% de las infecciones humanas por el "complejo *Entamoeba*"¹⁶, y que *E. moshkovskii* se ha hallado en heces humanas en América del Norte, Italia, Sudáfrica, Bangladesh, India, Tailandia, Australia, Turquía e Irán, con cifras hasta del 20% de parasitación en población infantil, e incluso en infecciones mixtas con las otras especies del complejo^{8,17}.

De las restantes especies, y dejando de un lado *E. polecki*, que alcanza en Papúa Nueva Guinea una prevalencia en humanos del 30%, muy asociada al contacto con cerdos, las prevalencias varían según los estudios estén realizados en países desarrollados o no, las edades de estudio o que la población sea o no sintomática. Sirva como ejemplo los datos que se conocen en nuestro país sobre este grupo de amebas: "complejo *Entamoeba*", el 3,2% en población sintomática frente al 0,1% en población asintomática; *E. hartmanni*, el 2 frente al 0,1%; *E. coli*, el 12 frente al 5,6%; *E. nana*, el 12 frente al 10,7%; *I. buetschlii*, el 0,9 frente al 0,2%¹⁸. Sin embargo, estas cifras varían cuando se pasa a considerar países en vías de desarrollo, y más en concreto determinadas zonas geográficas donde las condiciones higienicosanitarias y medioambientales son muy deficientes, lo que lleva a detectar prevalencias significativamente superiores: "complejo *Entamoeba*" hasta el 37,9%; *E. hartmanni* el 90,8%; *E. coli* el 91,4%; *E. nana* el 58,3%, e *I. buetschlii* el 54,7%¹⁹⁻²¹.

Otra característica epidemiológica común al grupo es que son especies consideradas no patógenas. Sin duda alguna existe consenso

sobre la consideración de tratarse de especies no asociadas a enfermedad, lo que no quita que en la bibliografía haya algunas evidencias que apunten en otro sentido. Por ejemplo, se ha notificado la existencia de trastornos gastrointestinales en pacientes infectados con *E. polecki*²² y con *E. dispar*²³, e incluso con infección mixta *E. dispar-E. moshkovskii*²⁴. En este sentido, se sabe que *E. dispar* puede producir in vitro lesiones intestinales de intensidad variable, llegando incluso a provocar destrucción del epitelio intestinal^{25,26}. Además, hay evidencia de cambios patológicos en algunos humanos después de la infección con esta especie²⁷. El caso de *E. moshkovskii* resulta más significativo, ya que los recientes estudios en diferentes países la señalan como el único enteropatógeno responsable de los síntomas gastrointestinales¹¹. Situación muy pareja se da en las restantes especies de amebas intestinales, básicamente en lo que a procesos diarreicos se refiere^{28,29}. A ello cabe añadir hallazgos puntuales de trofozoítos de *E. nana* en secciones histológicas del apéndice³⁰ y de *I. buetschlii* en un frotis cervical de rutina teñido con Papanicolaou³¹. Citas más esporádicas implican a *E. nana* en procesos cutáneos³² y de artritis reumatoide²⁹ y a *I. buetschlii* en un granuloma cerebral³³. Sin embargo, en la gran mayoría de estos trabajos subyace el hecho de no conocer con exactitud la existencia de otros procesos infecciosos o no infecciosos, coexistentes con los hallazgos de estas amebas intestinales o de multiparasitismos del propio "complejo *Entamoeba*", que pudieran permitir la justificación clínica pertinente.

Aunque al conjunto de estas amebas se las considere como no patógenas, no debiera resultar extraño pensar que la ocurrencia de ellas en el tracto gastrointestinal pudiera predisponer a la infección con otros enteropatógenos, modular la respuesta inmune y facilitar así infecciones secundarias e incluso diferentes grados de mutiparasitismo³⁴. De hecho, en portadores asintomáticos con infecciones individuales y mixtas de *E. histolytica/E. dispar*, *E. coli* y *E. nana*, se ha visto que tanto las propias especies implicadas, sincronizadas entre ellas en la producción quística, como el sexo del propio hospedador, juegan un papel relevante en su transmisión³⁵.

Consideraciones diagnósticas

El diagnóstico microscópico constituye la técnica de referencia para algunas de las especies de amebas intestinales consideradas, al presentar características morfológicas que permiten su diferenciación. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando lo que se pasa a considerar son las especies englobadas en el "complejo *Entamoeba*", en donde la convergencia morfológica imposibilita la diferenciación entre ellas y obliga a echar mano de otras herramientas diagnósticas.

Diagnóstico microscópico

El diagnóstico de laboratorio de las amebas intestinales no patógenas es idéntico al de cualquier protozoo intestinal que contemple las fases de trofozoito y de quiste. Aunque la primera suele aparecer en las heces diarreicas y los quistes en las heces formes, ambas fases pueden estar presentes en la misma muestra fecal. El excesivo tiempo que puede transcurrir entre el momento de la toma de la muestra y su procesado, así como la frecuente emisión intermitente de formas parasitarias a lo largo de los días, aconseja la recogida de un mínimo de 3 muestras, obtenidas preferentemente en días alternos, y en frascos adecuados que contengan líquido fijador o conservador. Los más recomendados y/o utilizados son el alcohol polivinílico (APV), la variante introducida exenta de mercurio Zn-APV (Para-Pak®), el acetato sódico-ácido acético-formalina (SAF), la formalina al 10%, la variante sin formaldehído y mercurio (Para-Pak® ECOFIX) y el mertiolato-yodo-formol (MIF).

Los trofozoítos y los quistes se pueden observar en las preparaciones de heces frescas con solución salina. En ocasiones, es preciso teñir estas preparaciones con solución yodada para identificar las especies.

Los métodos fisicoquímicos o difásicos de concentración, en concreto la técnica de Ritchie o técnica del formol-éter etílico o del formol-acetato de etilo, son los más utilizados, permitiendo concentrar las formas quísticas de los protozoos amébidos inicialmente dispersas en la muestra fecal. La adición de unas gotas de solución yodada permite apreciar los detalles necesarios para la identificación de las amebas, ya que confiere el típico color amarillento al citoplasma, contrastando con el color negruzco del núcleo.

La elaboración de un frotis fecal para su posterior tinción constituye el método microscópico más certero de diagnóstico coproparasitológico, al permitir visualizar las características más relevantes para poder identificar los trofozoítos y los quistes (tabla 1). Las ventajas de estos frotis frente a las preparaciones en fresco son que permiten: a) el diagnóstico más preciso de las formas parasitarias; b) la detección y reconocimiento de estructuras que no se identifican en preparaciones en fresco; c) la observación de los detalles nucleares, y d) la conservación de las preparaciones como registro permanente.

De entre las diferentes tinciones de frotis fecal utilizadas, la tricrómica de Gomori modificada o tinción de Wheatley es la más idónea, si bien requiere del previo uso como fijador fecal del APV o del Zn-APV. En caso de usar la hematoxilina férrica, el fijador más recomendado es el SAF. Para el Para-Pak® ECOFIX debe usarse la tinción EcoStain (Meridian Diagnostic). Con tinción tricrómica, los trofozoítos suelen tomar una coloración citoplasmática de verde a violácea, mientras que las estructuras nucleares, cuerpos cromatoidales, glóbulos rojos y demás elementos aparecen teñidos de color rojo violáceo oscuro. Con hematoxilina férrica, los trofozoítos en conjunto y el material de fondo de la preparación toman un color gris azulado a negro, lo que dificulta la detección. El uso del MIF como fijador fecal imposibilita la muestra para la realización de frotis fecal, aunque tiene la ventaja respecto de los anteriores de que proporciona directamente un color rosáceo-rojizo a las estructuras parasitarias. A pesar de ello, cuesta discernir las estructuras nucleares de los trofozoítos, requiriéndose de gran experiencia ya que el máximo aumento utilizado normalmente en la observación es 400x.

Estos frotis fecales se deben observar minuciosamente con objetivo de inmersión, prestando especial atención a la morfología y tamaño de los trofozoítos. No debe olvidarse que estas formas son muy sensibles y pueden sufrir degeneraciones relacionadas con la demora en el momento de la fijación de la muestra fecal. El núcleo es la primera estructura que se modifica, de manera que se produce fragmentación del cariosoma o alteración de la cromatina periférica o ambos, aunque también el citoplasma puede vacuolizarse. Por todo ello, la observación microscópica resulta compleja al no ser la típica esperable. Ejemplos de ello cabe encontrarlos en la diferenciación de las formas trofozoicas de *E. polecki* respecto de las especies del "complejo *Entamoeba*" o de la propia *E. coli*, o en la diferenciación entre los trofozoítos de *E. nana* e *I. buetschlii*.

Aunque los trofozoítos y quistes vivos tienen mayor tamaño que los fijados, en ocasiones es imprescindible medir convenientemente las estructuras parasitarias. Un ejemplo de ello sería la diferenciación entre *E. hartmanni* y las especies del "complejo *Entamoeba*", aunque ésta puede resultar dificultosa por la superposición de los límites superiores e inferiores del tamaño de estas especies. En este caso, la diferenciación se realiza porque el cariosoma de *E. hartmanni* es más pequeño y compacto que el del complejo, y además no se tiñe tan intensamente.

Finalmente, debe prestarse especial atención a la presencia de células epiteliales y macrófagos, que se pueden confundir con trofozoítos amebianos, y de leucocitos polimorfonucleares degenerados al poder ser motivo de confusión con las formas quísticas.

Diagnóstico por cultivo y análisis isoenzimático

Es uno de los métodos utilizados para la caracterización de las especies del "complejo *Entamoeba*", en concreto de *E. histolytica* y *E. dispar*, puesto que sus zimodemas han sido descritos con bastante

Tabla 1

Llave de identificación de los estadios de trofozoito y quiste de las amebas intestinales susceptibles de hallazgo en el examen de un frotis fecal teñido

Formas compatibles con trofozoítos amebianos

Presencia de cromatina perinuclear

Cromatina perinuclear fina y de disposición regular; cariosoma pequeño, compacto y de localización generalmente central; citoplasma finamente granulado

Tamaño: rango de 10 a 60 µm; usualmente 15-20 µm; citoplasma que puede contener bacterias

Glóbulos rojos ausentes: *Entamoeba dispar*/*E. moshkovskii*/*E. histolytica*Glóbulos rojos presentes: *E. histolytica*Tamaño: rango de 5 a 12 µm; usualmente 8-10 µm (glóbulos rojos ausentes): *E. hartmanni*

Cromatina perinuclear generalmente gruesa y de distribución irregular; cariosoma grande no compacto, a menudo excéntrico; citoplasma gruesamente granulado y vacuolado que puede contener bacterias, levaduras y otros detritus, pero no glóbulos rojos

Tamaño: rango de 15 a 50 µm, usualmente 20-25 µm: *E. coli*Tamaño: rango de 10 a 25 µm; usualmente 12-18 µm (en ocasiones, cromatina perinuclear fina y distribuida regularmente): *E. polecki*

Ausencia de cromatina perinuclear

Núcleo con cariosoma grande, a menudo irregular; citoplasma gruesamente granulado, muchas veces vacuolado, que puede contener bacterias

Tamaño: rango de 6 a 12 µm, usualmente 8-10 µm: *E. nana*

Núcleo con cariosoma grande; puede presentar gránulos acromáticos alrededor del núcleo o entre el núcleo y la membrana nuclear; citoplasma gruesamente granulado, muchas veces vacuolado, que puede contener bacterias, levaduras u otros detritus

Tamaño: rango de 8 a 20 µm; usualmente 12-15 µm: *Iodamoeba buetschlii***Formas compatibles con quistes amebianos**

Presencia de cromatina perinuclear

Quistes maduros de 1 núcleo; presencia de abundantes cuerpos cromidiales en racimo o una masa de inclusión de color oscuro

Tamaño: rango de 9-24 µm; usualmente 9-15 µm: *E. polecki*

Quistes maduros con más de 1 núcleo

Cuerpos cromidiales con extremos irregulares, en punta; quistes maduros de 8 núcleos, incluso 16; quistes inmaduros con 1, 2 o 4 núcleos con presencia frecuente de masa glucogénica

Tamaño: rango de 10-35 µm; usualmente 15-25 µm: *E. coli*

Cuerpos cromidiales en racimo; quistes maduros de 4 núcleos; quistes inmaduros con 1 o 2 núcleos, con presencia frecuente de glucógeno, y formas binucleadas frecuentes

Tamaño: rango de 5-10 µm; usualmente 6-8 µm: *E. hartmanni*

Cuerpos cromidiales con extremos redondeados; quistes maduros de 4 núcleos; quistes inmaduros con 1 o 2 núcleos, con presencia frecuente de masa de glucógeno

Tamaño: rango de 10-20 µm; usualmente 12-15 µm: *E. dispar*/*E. moshkovskii*/*E. histolytica*

Ausencia de cromatina perinuclear

4 núcleos (en raras ocasiones 1 núcleo); marcado cariosoma; glucógeno difuso

Tamaño: rango de 5 a 10 µm; usualmente 6-8 µm: *Endolimax nana*

1 núcleo; marcado cariosoma; vacuola de glucógeno muy visible

Tamaño: rango de 5 a 20 µm; usualmente 10-12 µm: *I. buetschlii*

detalle. No obstante, deben realizarse en laboratorios especializados, por cuanto que el éxito sólo es del 70% a partir de muestras clínicas, lo que conlleva un gran número de falsos negativos. Este hecho, junto con lo laborioso del proceso y el tiempo requerido para su realización, hace que no pueda ser considerado en el laboratorio como un método de rutina³⁶.

E. histolytica se ha cultivado en medios axénicos y no axénicos³⁶, a diferencia de lo que ocurre con algunas cepas de *E. dispar*, que sólo lo hacen en medios axénicos, como lo es el YI-S³⁷. En el caso de *E. moshkovskii* se pueden emplear los cultivos TP-S-1GM, TTY-SB, TYI-S-33 con suero bovino al 10% a 24 °C o el medio TYSGM-9 con suero bovino al 5% a 24 o 37 °C³⁸. El análisis isoenzimático se ha aplicado a la diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, no sin conllevar inmersa una problemática, ya que se ha descrito un total de 24 zimodemas, de los cuales 21 (9 de *E. histolytica* y 12 de *E. dispar*) proceden de muestras humanas³⁹. Sin embargo, muchas de las bandas parecen debidas a contaminaciones u otros microorganismos presentes en los cultivos, de manera que tan sólo 3 zimodemas de *E. histolytica* (II, XIV y XIX) y 1 de *E. dispar* (I) parecen fiables para la diferenciación de ambas especies⁴⁰.

La mayor rapidez, comodidad y sensibilidad de las técnicas inmunológicas y de análisis de ADN han venido a reemplazar este método diagnóstico.

Diagnóstico inmunológico

En la actualidad sólo hay pruebas destinadas a la detección de anticuerpos específicos frente a *E. histolytica*. Si además se considera

que *E. dispar* no genera respuesta de anticuerpos en pacientes infectados, la detección simultánea de anticuerpos antiameba, junto con el hallazgo de quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* en ausencia de sintomatología, puede resultar orientativo de una infección por *E. dispar*⁴¹. No obstante, antes de considerar este diagnóstico como definitivo se debe tener en cuenta que la persistencia de la IgG anti-*E. histolytica* hace que la aplicación de este tipo de pruebas deba limitarse a países desarrollados en los que la infección por *E. histolytica* sea poco frecuente⁴², ya que en áreas endémicas el contacto con *E. histolytica* es habitual, de manera que se estima que alrededor del 5-10% de la población presenta anticuerpos⁴³. Y a ello cabe añadir que aproximadamente sólo el 83% de infectados por *E. histolytica* presenta valores significativos de anticuerpos específicos⁴⁴. Estos hechos limitan considerablemente la utilidad de las pruebas serológicas para la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*. No obstante, en la actualidad hay un gran número de pruebas comercializadas para el diagnóstico de *E. histolytica* que, en las condiciones señaladas anteriormente, puede servir para diferenciar esta especie respecto de *E. dispar* o *E. moshkovskii* (tabla 2).

También se han desarrollado métodos destinados a la detección de antígenos de *E. histolytica*, los cuales presentan una serie de ventajas: a) muchos de ellos presentan unos altos niveles de sensibilidad y especificidad; b) son rápidos; c) son sencillos y pueden ser ejecutados por personal sin experiencia, y d) alguna de estas pruebas permite la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*⁷.

La prueba inmunocromatográfica comercializada empleando anticuerpos monoclonales frente a un antígeno de 29 kDa de *E.*

Tabla 2
Principales pruebas inmunológicas para el diagnóstico de *Entamoeba* spp.

Pruebas comercializadas	Método	Diferenciación <i>E. histolytica</i> - <i>E. dispar</i> ^a	Fabricante
<i>Detección de anticuerpos</i>			
Cellognost-Amoebiasis (IHA)	Hemaglutinación indirecta	No	Behring Diagnostics
Amibiasis Serology microwell EIA	ELISA indirecto	No	LMD Laboratories Inc.
BLA-Bichrolatex-Amibe	Aglutinación en látex	No	Fumouze Diagnostics
IHA- Amoebiasis	Hemaglutinación indirecta	No	Fumouze Diagnostics
Melotest Amoebiasis EIA	ELISA indirecto	No	Melotec S.A.
Novagnost Entamoeba IgG	ELISA indirecto	No	NovaTec Immunodiagnostica
Amoeba Spot IF	Inmunofluorescencia	No	Light Diagnostics
Amibiasis Serology microplate	ELISA indirecto	No	BioMérieux
RIDASCREEN Entamoeba IgG	ELISA indirecto	No	R-Biopharma AG
<i>Detección de antígenos</i>			
TechLab Entamoeba Test	ELISA de captura	No	TechLab
TechLab <i>E. histolytica</i> II	ELISA de captura	Sí	TechLab
Entamoeba CELISA-PATH	ELISA de captura	Sí	Cellabs Pty Ltd.
Optimum S Entamoeba histolytica ELISA	ELISA de captura	Sí	Merlin Diagnostika
Triage Parasite Panel	Inmunocromatografía	No	Biosite Diagnostics
ProSpecT Entamoeba histolytica microplate assay	ELISA de captura	No	Remel Inc.
RIDASCREEN Entamoeba	ELISA de captura	Sí ^b	R-Biopharma AG
Wampole <i>E. histolytica</i> test	ELISA de captura	No	Wampole laboratories

^aSegún indicaciones del fabricante.

^bDiferencia *E. histolytica* de *E. coli* y *E. hartmanni*.

histolytica/*E. dispar*, con una sensibilidad del 68 al 96% en función del método de referencia empleado^{45,46}, no presenta interés para la diferenciación entre *E. histolytica* y el resto de especies del género.

Existen técnicas de ELISA de captura de antígenos que permiten la detección específica de *E. histolytica* en heces, diferenciándola de otras especies del género, fundamentalmente de *E. dispar* (tabla 2). Estas pruebas están basadas en el uso de anticuerpos monoclonales frente a lectinas (“TechLab *E. histolytica* II” y “Entamoeba CELISA PATH kit”) o frente a un antígeno rico en serina (Optimum S Entamoeba histolytica antigen ELISA) de *E. histolytica* (tabla 2).

La prueba “TechLab *E. histolytica* II” captura y detecta en heces la lectina Gal/GalNac (adhesina) de *E. histolytica* mediante anticuerpos monoclonales frente a esta proteína⁴⁷. Esta lectina está altamente conservada, lo que permite la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Sin embargo, muestra una mayor reactividad cruzada dando lugar a algún falso positivo, fundamentalmente con *E. moshkovskii*⁴⁸.

Entamoeba CELISA PATH kit tiene un fundamento idéntico, si bien las diferencias radican en la cantidad de anticuerpo que sensibiliza cada pocillo y en que presenta una especificidad del 100%, sin reactividad cruzada con *E. dispar* o *E. moshkovskii*⁴⁸.

Optimum S Entamoeba histolytica antigen ELISA está basada en la captura de un antígeno rico en serina de *E. histolytica*. A pesar de que esta prueba es la más sensible de todas las citadas (100 trofozoítos/pocillo), presenta cierta reactividad cruzada con *E. dispar* en muestras con concentraciones elevadas de trofozoítos⁴⁹.

Aunque alguna de estas pruebas puede permitir la diferenciación entre algunas especies de *Entamoeba*, su empleo queda limitado por: a) requerir de otra prueba adicional que confirme la presencia de trofozoítos o quistes de *Entamoeba* spp., ya que se detectan específicamente antígenos de *E. histolytica*, y b) los antígenos a detectar se desnaturalizan por la fijación de las heces, por lo que estas pruebas sólo se pueden aplicar a heces frescas o congeladas.

Diagnóstico molecular

Aunque se trata de pruebas muy sensibles y específicas que pueden ser aplicadas a muestras fecales fijadas con APV, SAF o formalina, el empleo de técnicas de biología molecular para la diferenciación de amebas está limitado, actualmente, a laboratorios de investigación o especializados. Esto es debido, entre otras razones, a la laboriosidad, a su elevado precio y a la complejidad técnica, tanto de la extracción como de la amplificación del ADN de las heces⁵⁰. Hay métodos comercializados, como QIAamp DNA stool Kit (QIAGEN), que permiten una buena extracción fecal de ADN evitando el arrastre de posibles inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁵¹. Este método se puede optimizar mediante lavados adicionales o cambios en las condiciones de la digestión con la proteína K⁵². Además, hay sistemas de extracción automatizados, como la MagNA LC Workstation (Roche Applied Biosciences), el QIAGEN automated BioRobot M48 (QIAGEN) o el Nuclisens easy MAG (BioMérieux) que ofrecen buenos resultados⁸.

En la actualidad se conoce una gran variedad de técnicas basadas en PCR convencional que permiten la diferenciación entre las 3 especies del “complejo Entamoeba” que se basan en la diversidad genética que presenta el gen 18S rDNA o de genes codificantes de una proteína rica en serina, quitinasa, cisteín-proteasa y actina o hemolisina⁸.

Para diferenciar *E. histolytica* y *E. dispar* se han llevado a cabo modificaciones de la PCR convencional, como una PCR colorimétrica (PCR-SHELA) empleando el gen de la proteína SREPH como diana⁵³, y una PCR-SHELA que emplea ADN circular extracromosomal⁵⁴. Tiene un particular interés la PCR anidada multiplex para la detección simultánea de *E. histolytica* y *E. dispar*, que se ha utilizado con éxito incluso en heces fijadas con formalina⁵⁵.

Para la diferenciación de *E. moshkovskii* se ha desarrollado también una técnica de “riboprinting”⁵⁶ y una PCR anidada empleando el gen ribosomal 18S seguido de una digestión con endonucleasas⁵⁶⁻⁵⁸.

Recientemente, se ha desarrollado un protocolo de PCR *single-round* útil para la detección de *E. moshkovskii* y *E. dispar*, incluso en infecciones mixtas, si bien las pruebas se han realizado sobre materiales procedentes de cultivos¹⁷.

También hay técnicas de PCR en tiempo real para la identificación y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*, una de ellas diseñada para ser realizada en el Light Cycler, que emplea sondas de hibridación para detectar la amplificación del gen ribosomal *18S*⁵⁹, y otras 2 pruebas con sondas TaqMan, que utilizan como diana el gen *18S*^{60,61} y secuencias episomales⁶⁰. Aunque estas técnicas fueron desarrolladas para diferenciar especies de *Entamoeba*, los datos disponibles ofrecen dudas sobre su efectividad⁶². Además, cabe remarcar que todavía no se ha desarrollado técnica alguna que permita la identificación de *E. moshkovskii*.

La aplicación de los chips de ADN (*microarrays*) a la diferenciación de especies de *Entamoeba* es todavía muy limitada. Se ha desarrollado un método que posee una gran sensibilidad y especificidad para la identificación de *E. histolytica* y *E. dispar*, además de *E. moshkovskii*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum*, pero que únicamente se ha realizado con ADN purificado, no directamente en muestras fecales⁶³. También hay otra técnica para la caracterización de cepas de *Entamoeba*, permitiendo la diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*⁶⁴.

Consideraciones terapéuticas y profilácticas

La consideración de que se trata de un grupo de amebas no patógenas impide realizar comentario terapéutico alguno. No obstante, convendría dejar la puerta abierta al facultativo especialista que decida dar tratamiento, habiendo descartado la existencia de otras causas infecciosas o no infecciosas, a un individuo con sintomatología intestinal y parasitado por alguna de estas amebas. En estos casos, se puede usar fármacos habituales en el tratamiento de la amebiasis bajo la forma intestinal leve o moderada, y que están disponibles en España, como son el metronidazol y el tinidazol⁶⁵. En la bibliografía cabe encontrar referencias a ambos fármacos, incluso asociados a medicamentos no comercializados en nuestro país, como el furoato de diloxanida^{22,28,66}.

Las medidas a seguir para evitar la infección por este grupo de amebas deben ser las mismas que para cualquier otra protozoosis intestinal y que básicamente están encaminadas a interrumpir la transmisión fecal-oral de los quistes infectantes procedentes del hospedador. Para ello se requiere de una adecuada educación de la población relacionada con el lavado de manos después de defecar y antes de comer, evitar el consumo de agua no convenientemente potabilizada, de frutas y verduras crudas sin lavar, y evitar la transmisión sexual vía anal-oral.

Por último, no se debe olvidar que la detección de una o más de estas amebas no patógenas en las heces de una persona, aunque no se le confiera relevancia clínica, sí la tiene desde la perspectiva epidemiológica, ya que viene a indicar una deficiente educación higienicosanitaria. En este sentido, recordar la existencia de otros agentes infecciosos, parásitos o no, de reconocida patogenicidad y que comparten la misma ruta de infección.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool.* 1980;27:37-58.
- Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 1993;57:953-94.
- WHO. Amoebiasis. Report on the WHO/Pan American Health Organization / UNESCO Expert Consultation Mexico City Geneva- WHO. *Wkly Epidemiol Rec.* 1997;72:97-100.
- Ruehsen MD, McNeill RE, Frost JK, Gupta PK. Amoeba resembling *Entamoeba gingivalis* in the genital tracts of IUD users. *Acta Cytol.* 1980;24:413-30.
- Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of the nucleus of the *Iodamoeba bütschlii* cyst. *Parasitol Res.* 1998;84:421-2.
- Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. Ultrastructure of the *Endolimax nana* cyst. *Parasitol Res.* 2000;86:54-6.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:713-29.
- Fotadar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:511-32.
- Ash LR, Orihel TC. Atlas de Parasitología Humana. 5.^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukariot Microbiol.* 1993;40:340-4.
- Fotadar R, Strak D, Marritt D, Ellis J, Harkness JE. *Entamoeba moshkovskii* infections in Sydney, Australia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:133-7.
- Clark CG, Diamond LS. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;46:11-8.
- Burrows RB. Morphological differentiation of *Entamoeba hartmanni* and *E. polecki* from *E. histolytica*. *Am J Trop Med Hyg.* 1959;8:583-9.
- Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1644-6.
- Huston CD, Petri WA Jr. Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Curr Infect Dis Rep.* 1999;1:441-7.
- Clark CG. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92:361-4.
- Mojarad EN, Nochi Z, Sahebkhietari N, Nejad MR, Dabiri H, Zali MR, et al. Discrimination of *Entamoeba moshkovskii* in patients with gastrointestinal disorders by single-round PCR. *Jp J Infect Dis.* 2010;63:136-8.
- Belda S. Estudio epidemiológico del parasitismo intestinal infantil en el Departamento 10 de Salud de la Comunidad Valenciana. Trabajo de Investigación, DEA, Dir. Dr. J.G. Esteban, Programa Doctorado "Parasitología Humana y Animal", Facultad de Farmacia. Valencia: Universitat de València; 2006.
- Esteban JG, Flores A, Aguirre C, Strauss W, Anglés R, Mas-Coma S. Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Trop.* 1997;66:1-14.
- Esteban JG, González, Bargues MD, Anglés R, Sánchez C, Náquira C, et al. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop Med Int Health.* 2002;7:339-48.
- Esteban JG, González C, Curtale F, Muñoz-Antolí C, Valero A, Bargues MD, et al. Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:429-37.
- Salaki JS, Shirey JL, Strickland GT. Successful treatment of symptomatic *Entamoeba polecki* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1979;28:190-3.
- Jetter A, Walderich B, Britten D, Mete O, Gorol V, Burchard GD, et al. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in eastern Turkey using a colorimetric polymerase chain reaction. *Arch Med Res.* 1997;28 Suppl:319-21.
- Parija SC, Khairnar K. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. *J Health Pop Nutr.* 2005;23:292-5.
- Vohra H, Bhatti HS, Ganguly NK, Mahajan RC. Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83:648-50.
- Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller, et al. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties, and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45:265-72.
- McMillan A, Gilmour HM, McNeillage G, Scott GR. Amoebiasis in homosexual men. *Gut.* 1984;25:356-60.
- Stauffer JQ, Levine WL. Chronic diarrhea related to *Endolimax nana* response to treatment with metronidazole. *Am J Dig Dis.* 1974;19:59-63.
- Burnstein SL, Liakos S. Parasitic rheumatism presenting as rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1983;10:514-5.
- Cerva L, Schrottenbaum M, Kliment V. Intestinal parasites: a study of human appendices. *Folia Parasitol (Praha).* 1991;38:5-9.
- Arava S, Sharma A, Iyer VK, Mathur SR. *Iodamoeba bütschlii* in a routine cervical smear. *Cytopathology.* 2009;doi:10.1111/j.1365-2303.2009.00717.x.
- Veraldi S, Schianchi-Veraldi R, Gasparini G. Urticaria probably caused by *Endolimax nana*. *Int J Dermatol.* 1991;30:376.
- Kernohan JW, Magath TB, Schloss GT. Granuloma of brain probably due to *Endolimax williamsi* (*Iodamoeba bütschlii*). *Arch Pathol.* 1960;70:576-80.
- Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitol Res.* 2005;98:38-43.
- Garrido-González E, Zurabian R, Acuna-Soto R. Cyst production and transmission of *Entamoeba* and *Endolimax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96:119-23.
- Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:329-41.
- Kobayashi S, Imai E, Tachibana H, Fujiwara T, Takeuchi T. *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45:35-8S.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978;72:431-2.
- Blanc D, Sargeant PG. *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of gamma and delta bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. *Exp Parasitol.* 1991;72:87-90.

40. Jackson TF, Suparsad S. Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Arch Med Res.* 1997;28:304-5.
41. Haque R, Petri WA Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res* 2006;37:273-6.
42. Ohnishi K, Murata M. Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in three east-southeast area of Tokyo. *Epidemiol Infect.* 1997;119:363-7.
43. Singh A, Houtp E, Petri WA. Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa, with a focus on *Entamoeba histolytica*. *Interdiscipl Perspect Infect Dis.* 2009;doi: 10.1155/2009/547090.
44. Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Myhsok B, Buss H, et al. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:578-83.
45. Pillai DR, Kain KC. Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica-E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3017-9.
46. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3337-40.
47. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol.* 1998;36:449-52.
48. Stark D, Van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1678-81.
49. Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, Kain KC. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of non endemicity. *Clin Infect Dis.* 1999;29:1315-8.
50. Holland JL, Louie L, Simor AE, Louie M. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4108-13.
51. Verweij JJ, Blotkamp J, Brien EA, Aguirre A, Polderman AM. 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.
52. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA Jr, Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Clin Microbiol.* 2005;43:2168-72.
53. Ayeh-Kumi PF, Ali IM, Lockhart LA, Gilchrist CA, Petri WA Jr, Haque R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp Parasitol.* 2001; 99:80-8.
54. Aguirre A, Molina S, Blotkamp C, Verweij J, Vinuesa T, Valls ME, et al. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical specimens by PCR-SHELA. *Arch Med Res.* 1997;28:285-7.
55. Paglia MG, Visca P. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. *Acta Trop.* 2004;92:273-7.
56. Ali IM, Hossain K, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA Jr, Haque R, et al. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:580-4.
57. Fotedar R., Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1035-7.
58. Khairnar K, Parija SC, Palaniappan R. Diagnosis of intestinal amebiasis by using nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *J Gastroenterol.* 2007;42:631-40.
59. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:450-7.
60. Verweij JJ, Laeijendecker D, Brien EA, Van Lieshout L, Polderman AM. Detection and identification of *Entamoeba* species in stool samples by a reverse line hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5041-5.
61. Kebede A, Verweij JJ, Endeshaw T, Messele T, Tasew G, Petros B, et al. The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol.* 2004;98:43-8.
62. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5491-7.
63. Wang Z, Vora GJ, Stenger DA. Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3262-71.
64. Shah PH, MacFarlane RC, Bhattacharya D, Matese JC, Demeter J, Stroup SE, et al. Comparative genomic hybridizations of *Entamoeba* strains reveal unique genetic fingerprints that correlate with virulence. *Eukaryot Cell.* 2005;4:504-15.
65. Pérez-Molina JA, Díaz-Menéndez M, Pérez-Ayala A, Ferrere F, Monje B, Norman F, et al. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:44-59.
66. Spillman R, Ayala SC, De Sánchez CE. Double-Blind test of Metronidazol and Tinidazole in the treatment of asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba hartmanni* carriers. *Am J Trop Med Hyg.* 1976;25:549-51.