

ISSN 0120-4137

# Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

## PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

### Citación provisional:

**Rivero Z, Villarreal L, Bracho A, Prieto C, Villalobos R.** Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en niños con diarrea de Maracaibo, Venezuela. *Biomédica*. 2021;41 (Supl. 1).

Recibido: 21-05-20

Aceptado: 23-11-20

Publicación en línea: 04-12-20

**Identificación molecular de *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en niños con diarrea de Maracaibo, Venezuela**

**Molecular identification of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* in children with diarrhea from Maracaibo, Venezuela**

**Identificación molecular de *Entamoeba spp.* en niños con diarrea**

Zulbey Rivero <sup>1,2</sup>, Lisbeth Villarreal <sup>3</sup>, Ángela Bracho <sup>2</sup>, Carem Prieto <sup>4,5</sup>, Rafael Villalobos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> **Incluir sección institucional**, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

<sup>2</sup> **Incluir sección institucional**, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador

<sup>3</sup> Laboratorio Clínico del Servicio Autónomo, Hospital Universitario de Maracaibo, Maracaibo, Venezuela

<sup>4</sup> **Incluir sección institucional**, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador

<sup>5</sup> Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas “Dr. Félix Gómez”, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

#### **Correspondencia:**

Zulbey Rivero, Ciudadela Universitaria, Calle Nueva, Portoviejo, Ecuador.

Teléfono: +593969072567

[zulbeyrivero@gmail.com](mailto:zulbeyrivero@gmail.com)

#### **Contribución de los autores:**

Zulbey Rivero: concepción y diseño de la investigación, y redacción del manuscrito.

Lisbeth Villareal: adquisición, análisis e interpretación de resultados.

Angela Bracho: contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito y redacción del manuscrito.

Carem Prieto y Rafael Villalobos: interpretación de resultados y revisión crítica de contenido.

**Introducción.** *Entamoeba histolytica* es el parásito productor de amebiasis, sin embargo; *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba bangladeshi*, son amebas no patógenas, morfológicamente idénticas a ésta, por lo que se necesitan técnicas moleculares para su diferenciación.

**Objetivo.** Identificar la frecuencia de las especies de *Entamoeba* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), en muestras fecales de niños menores de 5 años con diarrea, provenientes de Maracaibo, Venezuela.

**Materiales y métodos.** Se recolectó una muestra fecal por individuo en 75 niños con diarrea (grupo de casos) y 25 niños sin diarrea (grupo control). Las heces fueron evaluadas mediante examen microscópico, método de concentración de formól-éter y RCP *nested-multiplex* en una sola ronda, para la identificación de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*. Además, se realizó una encuesta en la que se definieron datos demográficos, signos, manifestaciones clínicas y estrato socioeconómico.

**Resultados.** 48% de los niños (38 del grupo muestra y 10 del grupo control) presentaron enteroparásitos. Solo 4 niños presentaron en sus muestras quistes del complejo *Entamoeba*, (3 grupo muestra y 1 de control). Mediante RCP 9 muestras (9%), amplificaron para las amebas estudiadas. En el grupo muestra: 3 (28,13%) para *E. histolytica*, 4 (30,50%) para *E. dispar* y 1 (9,37%) para *E. moshkovskii*; mientras que solo 1 (25%) muestra amplificó para *E. dispar* en el grupo control.

**Conclusión.** En general predominó *E. dispar*; sin embargo, todos los infectados con *E. histolytica* se detectaron dentro del grupo de niños con diarrea y fue detectado el primer caso de *E. moshkovskii* en la región.

**Palabras clave:** *Entamoeba*; *Entamoeba histolytica*; reacción en cadena de la polimerasa multiplex; niño; diarrea; Venezuela.

**Introduction:** *Entamoeba histolytica* is the amebiasis-producing parasite, however; *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba bangladeshi* are non-pathogenic amoebae, morphologically identical to this one, so molecular techniques are needed for their differentiation.

**Objective:** To identify the frequency of *Entamoeba* species by Polymerase Chain Reaction (PCR), in fecal samples from children under 5 years of age with diarrhea, from Maracaibo, Venezuela.

**Materials and methods:** A fecal sample was collected per individual from 75 children with diarrhea (case group) and 25 children without diarrhea (control group). Stools were evaluated by microscopic examination, formol-ether concentration method and *nested-multiplex* PCR in a single round, for the identification of *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii*. In addition, a survey was conducted in which demographic data, signs, clinical manifestations, and socioeconomic status were defined.

**Results:** 48% of the children (38 from the case group and 10 from the control group) had intestinal parasites. Only 4 children presented cysts of the *Entamoeba* complex in their samples, (3 from case group and 1 control group). By means of PCR 9 samples (9%) amplified for the studied amoebae. In the case group: 3 (28.13%) for *E. histolytica*, 4 (30.50%) for *E. dispar* and 1 (9.37%) for *E. moshkovskii*; while only 1 (25%) sample amplified for *E. dispar* in the control group.

**Conclusion:** In general, *E. dispar* predominated; however, all those infected with *E. histolytica* were detected within the group of children with diarrhea and the first case of *E. moshkovskii* was detected in the region.

**Keywords:** *Entamoeba*; *Entamoeba histolytica*; multiplex polymerase chain reaction; child; diarrhea; Venezuela.

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario y el agente causante de la amebiasis en humanos. Esta infección afecta principalmente a personas de países en desarrollo, con condiciones de higiene limitadas, donde es endémica, siendo los niños menores de 5 años los más susceptibles a desarrollarla. Las estimaciones de la carga mundial de amebiasis por parte de la OMS indicaron que aproximadamente 500 millones de personas estaban infectadas con el parásito y el 10% de estos individuos tenían amebiasis invasiva. Es considerada un importante problema de salud pública, ya que, puede llegar a producir cuadros disentéricos amebianos que, de no ser tratados, pueden llevar al paciente a la deshidratación y hasta la muerte (1-3).

Ngobeni y col. refieren que el término ameba engloba las especies pertenecientes a los géneros *Entamoeba*, *Endolimax* e *Iodamoeba*; donde destaca *Entamoeba histolytica*, única ameba intestinal de reconocido papel patógeno al ser responsable de la amebiasis. Las restantes especies que pueden encontrarse en la luz del intestino incluyen: *Entamoeba dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmannii*, *E. coli*, *E. polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii*, consideradas no patógenas (4).

Existen otras especies de *Entamoeba* como *E. gingivalis* que se encuentra principalmente en la cavidad oral humana, incluso también se ha encontrado en el tracto genitourinario de usuarios de dispositivos anticonceptivos intrauterinos en Egipto (5) y *E. nuttalli*, que prevalece en primates no humanos, aunque se ha detectado en un cuidador de un zoológico en Bélgica (6).

Las amebas del género *Entamoeba* comparten muchas características morfológicas y biológicas; pero en particular las caracteriza el hecho de poseer cromatina adosada a la membrana interna nuclear y presentar dos formas evolutivas durante su ciclo de vida, los trofozoítos o formas vegetativas y los quistes o formas de

resistencia (7). Los trofozoítos y quistes de *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi* son morfológicamente indistinguibles entre sí, por lo que existe el consenso en denominarlas como complejo *Entamoeba* (2,8).

El diagnóstico de la amebiasis comúnmente se realiza mediante examen coprológico, a través de la observación microscópica de quistes o trofozoítos morfológicamente compatibles con *E. histolytica*, en las heces o con menos frecuencia en la biopsia de tejido mucoso. Sin embargo, el reconocimiento de *E. dispar*, la detección de *E. moshkovskii* en seres humanos, sumado a la nueva especie, *E. bangladeshi*; ha complicado el diagnóstico, pues todas son morfológicamente idénticas, pero diferentes desde el punto de vista genético y bioquímico (9,10).

El examen microscópico de materia fecal presenta serias limitaciones, siendo la más importante de ellas, la incapacidad de distinguir entre *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi*; donde solo puede confirmarse la presencia de *E. histolytica* cuando las muestras presentan trofozoítos hematófagos, situación que es bastante infrecuente (9). En este sentido, los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), han demostrado tener mayor sensibilidad de detección, cuando son comparados con otras técnicas de diagnóstico de amebiasis; por lo tanto, la RCP se ha convertido en la prueba estándar de oro, al evaluar la eficacia de otras técnicas para el diagnóstico de amebiasis intestinal (3).

No existen publicaciones previas sobre la prevalencia de *E. moshkovskii* en Venezuela y existe muy poca información en cuanto a la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en el país. Es por ello que el objetivo de la presente investigación fue determinar, mediante métodos moleculares, la frecuencia de estas amebas en niños del municipio Maracaibo, estado Zulia, Venezuela y asociar dicha frecuencia con la presencia o no de diarrea.

## **Materiales y métodos**

### ***Diseño y tipo de la investigación***

Se diseñó una investigación de tipo descriptivo, prospectivo y transversal.

### ***Población y muestra***

La población bajo estudio estuvo comprendida por todos los niños menores de 5 años con diarrea (área de emergencia) y sin diarrea (triaje de pediatría) que asistieron al Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM) desde enero hasta julio de 2014.

Se recolectaron 100 muestras de heces frescas de la siguiente manera: 75 de niños menores de 5 años con diarrea aguda, consideradas como grupo de casos y 25 muestras de heces de niños menores de 5 años sin diarrea, consideradas como grupo control. Como criterios de inclusión para el grupo de casos fueron: niños menores de 5 años, de cualquier sexo, con diarrea, que asistieron al área de emergencia del SAHUM y que no recibieron tratamiento antiparasitario 2 meses antes. Los niños evaluados fueron estratificados por grupos etarios según la clasificación de Quintero (11).

Se realizó una encuesta a todos los niños incluidos en el estudio, la cual fue respondida por su representante, e incluyó la siguiente información: datos demográficos: edad, sexo y procedencia. Signos y síntomas: diarrea, presencia de deshidratación, vómito y fiebre. Posteriormente se realizó estratificación socioeconómica según Graffar modificado por Méndez y de Méndez (12).

### ***Análisis parasitológico***

Se recolectó una muestra fecal por niño, para ello a cada representante se le entregó un envase recolector plástico nuevo, limpio, de boca ancha y tapa de rosca (sin preservativos) y se le explicó las recomendaciones necesarias para la correcta recolección de la muestra fecal tanto de forma oral como escrita.



Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia, donde se realizó el examen macroscópico y microscópico de la muestra fecal, así como el método de concentración de formól-éter (13). Los resultados del examen coproparasitológico fueron entregados a cada representante. Una porción de la muestra fue congelada a -20 °C para efectuar posteriormente el análisis molecular (RCP) en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas “Dr. Félix Gómez” (CIEM), para la detección de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

### **Análisis por biología molecular**

La extracción y purificación del ADN genómico de *Entamoeba* spp. se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia, a través de un procedimiento estandarizado que incorporó algunos pasos de protocolos de lisis enzimática, choque térmico y mecánico, descritos previamente por Rivero y col. (14).

Todas las reacciones de RCP se llevaron a cabo en un volumen total de 40,0 µL; con 8 µL de buffer para RCP 10X, 2,4 µL de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25,0 mmol/l; 1 µL de la mezcla de desoxiribonucleótidos (5,0 mmol/L de cada uno); 0,5 µL de GoTaq polimerasa de Promega® (5 UI/µL); 4 µL de la mezcla de oligonucleótidos (50 pmol de cada primer) y 15,0 µL del ADN muestra.

Se emplearon como controles de referencia: *E. histolytica*, la cepa HM-1: IMSS; para *E. dispar* la cepa SAW760 y de *E. moshkovskii* la cepa Laredo, todas gentilmente donadas por el Dr. Graham Clark del London School of Hygiene & Tropical Medicine. En estos casos se utilizó 6 µL de ADN para los ensayos de amplificación por RCP de los controles. Además, se utilizó un control negativo de reacción, que solo contenía 1 uL de agua.

Se utilizó como blanco genómico la secuencia de genes similares al ARNr 16S, con un fragmento específico para el género *Entamoeba* y fragmentos específicos (primers) para las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* (Eurofins Genomics) descritos por Khairnar y Parija (15) (cuadro 1). La identidad de las secuencias de oligonucleótidos utilizados y el peso molecular (PM) de los fragmentos esperados, fueron confirmados por BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Se realizó un protocolo de RCP *nested-multiplex*, estandarizado por los autores de esta investigación para ser efectuado en una sola reacción, a partir del protocolo original de Ngui y col. (16), donde se realizó el anidado de la región específica para el género *Entamoeba* de genes similares al ARNr 16S, que comprende una desnaturalización inicial de 94°C por 10 min, seguido de 15 ciclos con los siguientes pasos: Desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 56°C por 1 min y extensión a 72°C por 1:15 min (no se obtiene un producto para ser verificado en gel de agarosa); en la misma amplificación se programaron 25 ciclos del siguiente esquema: 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, 72°C por 1:15 min y finalmente 72°C por 10 min, en este paso se realizó la multiplex para caracterización genética de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* obteniendo fragmentos de 439 pb, 174 bp y 553 bp. Los tubos Eppendorf se mantuvieron a 4°C hasta salir del equipo. Todas las muestras fueron corridas en un termociclador Eppendorf (PTC-100 Peltier Thermal Cycler).

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,0% en cámaras horizontales (Bio-Rad Laboratories). Como buffer de corrida se utilizó solución amortiguadora TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2mM, pH: 8), la corrida se llevó a cabo a 100v/cm por 30 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) y luego se visualizaron en un transiluminador ultravioleta

(Uvitec) y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP. Se incluyó marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder de Promega ®.

### ***Análisis estadístico***

Se emplearon distribución de frecuencias absolutas y porcentajes para mostrar la frecuencia de las amebas en relación a las variables estudiadas. Para el análisis de los resultados obtenidos a través de los métodos empleados, se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17 (SPSS Inc. Chicago, Ill, USA). Se empleó el estadístico Ji cuadrado, exacto de Fisher o correlación de Spearman, según correspondiese, para pruebas de significancia estadística entre las variables en estudio. Un valor de  $p < 0,05$  fue aceptado como estadísticamente significativo (17).

### ***Consideraciones éticas***

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del SAHUM. Por tratarse de una investigación no terapéutica donde se trabaja con las muestras fecales de niños menores, los padres fueron los que autorizaron la entrega de la muestra, mediante el consentimiento informado y dieron la información necesaria para el llenado de la encuesta. Los datos relativos a la información del paciente se mantienen en grado de confidencialidad elevado.

### **Resultados**

La mediana de edad de los niños estudiados fue de  $3 \pm 1,093$  años, siendo el menor individuo estudiado de 5 meses y el mayor de 5 años. En total participaron 38 niñas (31 grupo de casos y 7 grupo control) y 62 varones (42 grupo de casos y 18 grupo control). El 48% de los niños (38 del grupo de casos y 10 del grupo control) presentaron enteroparásitos; mediante el examen microscópico directo o por concentración. Mediante este procedimiento, se detectaron 3 individuos del grupo de casos (4,6%) y 1 del grupo control (7,1%), que presentaron quistes del complejo *Entamoeba* en sus muestras fecales.

Como resultado de la RCP aplicada a las 100 muestras, se evidenció la amplificación de 9 muestras biológicas (figura 1), distribuidas de la siguiente manera: 3 muestras para *E. histolytica*, 5 para *E. dispar* y 1 para *E. moshkovskii*.

En el cuadro 2, se muestran los resultados de la RCP según grupo de estudio, es decir para grupo de casos y control. Se aprecian 8 muestras positivas dentro del grupo de casos, 3 (37,5%) corresponden a *E. histolytica*, 4 (50%) a *E. dispar* y 1 (12,5%) a *E. moshkovskii*; mientras que en el grupo control solo se identificó 1 individuo con *E. dispar* (100%); no hubo casos de infección simultánea por 2 o más especies de amebas estudiadas entre los niños evaluados.

Los parásitos encontrados en infección simultánea a *E. histolytica* fueron los helmintos *Ascaris lumbricoides* (50%) y *Trichuris trichiura* (50%), no se encontró asociada con algún protozooario intestinal. En los niños con *E. dispar* se presentó la mayor cantidad de asociaciones. Se observó en conjunto a *Blastocystis sp.* (16,6%) y a protozoarios tales como: *Entamoeba coli* (33,3%), *Endolimax nana* (16,6%), *Giardia lamblia* (16,6%) y helmintos como *A. lumbricoides* (16,6%). En el caso de *E. moshkovskii*, no se observó asociado a ningún otro parásito. Se detectaron infecciones exclusivas por *E. histolytica* y *E. dispar* de un caso cada una, donde no estaban asociadas a ningún helminto o protozooario intestinal.

Mediante examen microscópico, solo se observaron 4 muestras (4%) positivas al complejo *Entamoeba*, todos ubicados en el grupo de preescolares. Una vez efectuado el procesamiento por RCP, se logró evidenciar un mayor número de casos, resultando positivos 9 niños, detectándose casos de estas amebas tanto en el grupo de lactantes mayores (1%) como en el de lactantes menores (1%), además de algunos casos más dentro de los mismos preescolares. En forma general, se encontró un predominio de las amebas en el grupo de niños entre 2 y 5 años, al detectarse 3% para *E. histolytica* y 4% para *E. dispar*. Apenas un caso de *E. dispar*

se detectó en lactantes mayores. Se destaca que el único caso de *E. moshkovskii* observado correspondía a un lactante menor (6 meses). No se determinó diferencia significativa por esta variable ( $p>0,05$ ).

En relación con la prevalencia de las amebas estudiadas en cuanto al sexo de los niños participantes en el estudio, se apreció que la mayoría de los casos de infección por *E. histolytica* (2%), *E. dispar* (4%) y *E. moshkovskii* (1%) se detectaron en el sexo masculino; aun así, no se determinó diferencia significativa ( $p>0,05$ ).

En el caso de las variables prevalencia de las amebas y estrato socioeconómico de los niños se evidenció que todos los casos de infección por *E. histolytica* se encontraron en niños que corresponden al estrato de pobreza crítica; mientras que los casos de *E. dispar* se encontraron repartidos entre los dos estratos más pobres de la escala (pobreza relativa y crítica), el único caso de *E. moshkovskii* detectado pertenecía al estrato de pobreza relativa.

## **Discusión**

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre la infección por *E. histolytica* se desarrollaron antes de la descripción de las especies del complejo *Entamoeba*. Entonces existe una clara necesidad de desarrollar estudios epidemiológicos para distinguir entre las especies de amebas y determinar la verdadera prevalencia de la infección por *E. histolytica*. En el presente estudio se logró identificar exitosamente, mediante la técnica de RCP empleada, la presencia de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* en las heces de niños menores de 5 años con y sin diarrea que asistieron al SAHUM.

Del total de muestras analizadas, se destacó un predominio de la especie *E. dispar* (5 muestras), seguido de *E. histolytica* (3 muestras). Estos resultados coinciden con la investigación realizada previamente por Bracho y col. (18) en niños con diarrea del SAHUM, donde predominaron las infecciones por *E. dispar*. Estos autores refieren

que 6 muestras (12%) presentaron ADN de *E. dispar* y 2 (4%) ADN de *E. histolytica*, ningún niño presentó asociación entre las amebas estudiadas.

Un estudio realizado en comunidades rurales al noreste de Sur África, reseña prevalencias de *E. histolytica* de 4,1%, *E. dispar* de 14,7% y *E. moshkovskii* de 15,9% (19). Sharbathkori y col. (20) determinaron la prevalencia de *Entamoeba* sp. en niños con disentería de Irán y encontraron *E. histolytica* y *E. dispar* en dos (2/25, 8%) y tres (3/25, 12%) muestras, respectivamente. De igual forma en Colombia, López y col. (21) realizaron estudios para diferenciar el complejo *E. histolytica/E. dispar* mediante la detección de Gal/GalNAc-lectina y RCP. Sus resultados fueron una prevalencia de 0,6-1,4% para *E. histolytica* y de 15-17% para *E. dispar*.

Múltiples estudios basados en pruebas de biología molecular a nivel internacional señalan el predominio de las infecciones por *E. dispar* en relación a las de *E. histolytica* (8,22-25).

Algunos estudios realizados en población general tanto en nivel nacional como internacional contrastan con estos resultados. Es el caso de Mora y col. (26) que establecieron la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en pacientes con diarrea de Cumaná, Venezuela. Por RCP la prevalencia de *E. histolytica* fue de 6,3% y de *E. dispar* de 4,44%, detectándose cuatro casos de infecciones mixtas. Los más afectados por ambas especies fueron niños y jóvenes. Ngui y col. (16) estudiaron comunidades rurales de Malasia y refieren que la infección con *E. histolytica* (75,0%; 39/52) fue la más común, seguida de *E. dispar* (30,8%; 18/52) y *E. moshkovskii* (5,8%; 3/52). De estos casos, 33 (63,5%) individuos presentaban solo *E. histolytica*, 10 (19,2%) portaban exclusivamente *E. dispar* y 3 (5,8%) solo *E. moshkovskii*; 6 muestras (11,5%) presentaron infección mixta de *E. histolytica* y *E. dispar*. De igual forma, estudios realizados por Roshdy y col. (27) en pacientes con disentería en un hospital del Cairo, Egipto, utilizando RCP *nested multiplex* y RCP en tiempo real,

señalaron un 10,3% de prevalencia de *E. histolytica*, 8,7% de *E. dispar*, sin casos de *E. moshkovskii*.

En la presente investigación, solo se detectó un caso de *E. moshkovskii*, en un niño de 6 meses con diarrea. Es importante resaltar que este es el primer informe de *E. moshkovskii* en niños de la región zuliana y en el país. El primer reporte de esta ameba en humanos fue efectuado por Haque y col. (28) en una niña de Bangladesh. Posteriores estudios realizados en Bangladesh, en los que se emplearon herramientas moleculares, revelaron una prevalencia de *E. moshkovskii* del 21% en niños de 2 a 5 años (29).

En Latinoamérica existen muy pocas referencias sobre la detección de *E. moshkovskii* en humanos; solo en Ecuador, Colombia, Brasil y Venezuela se han realizado investigaciones sobre esta especie. Levecke (30) refiere que, de 674 muestras de una comunidad rural al sur de Ecuador, solo 101 contenían quistes del complejo *Entamoeba*; sin embargo, a través de RCP-RLHB se detectaron 22,8% casos de *E. dispar*, mientras que infecciones por *E. histolytica* y *E. moshkovskii* no fueron identificadas. Ahmar (31), evaluó mediante PCR 150 muestras de niños de 0 a 10 años del estado Sucre, Venezuela, las cuales eran microscópicamente positivas al complejo *Entamoeba* y a través de técnicas moleculares refiere que un 19,30% de las muestras amplificaron para *E. histolytica*, 4% para *E. dispar* y 4,70% presentó asociación de ambas amebas; no se detectó *E. moshkovskii*.

López y col. (32) realizaron un estudio en un área rural al centro de Colombia, utilizando RCP multiplex, y mostraron una frecuencia del 49,1% (89/181).

Diferenciando por especie 23,2% (42/181) muestras positivas para *E. dispar*, 25,4% (46/181) para *E. moshkovskii* y 0,55% (1/181) para *E. histolytica*, observándose adicionalmente infecciones mixtas entre *E. dispar* y *E. moshkovskii* en un 4,42% (8/181) de las muestras. En el mismo contexto Soares y col. (33) realizaron un

estudio en muestras de pacientes que asistían al laboratorio de Bahía, Brasil. La investigación se llevó a cabo por diferentes técnicas: microscopia, encontrándose un 0,49% de prevalencia del complejo *Entamoeba* (273/55.218). De esas 273 muestras positivas, solo 90 individuos aceptaron participar en el estudio y se demostró un 8,9% de positividad (8/90) por serología; mientras que de las muestras analizadas por RCP se encontraron 72/90 (80%) correspondientes a *E. dispar*, no fue posible identificar *E. histolytica* y *E. moshkovskii* y no amplificaron el resto de las muestras (18/90); por lo que se puede concluir que de los países mencionados, solo en Colombia se había referido la presencia de *E. moshkovskii*.

Es importante mencionar el estudio realizado por Ngui y col. (34), en el cual examinaron 504 muestras fecales de humanos y perros a través de microscopia y RCP en Malasia, mostrando la especie más común a *E. dispar* (26,5%; 13/49) seguida por *E. histolytica* y *E. moshkovskii*, (20,4% para cada especie respectivamente). En los animales, *E. moshkovskii* (46,7%) fue la especie más común detectada, seguida por *E. histolytica* y *E. dispar*, a 20,0% y 13,3% respectivamente. Todo esto demuestra la presencia de la especie patógena de *Entamoeba* en perros, señalando que podrían ser un reservorio o un hospedero mecánico para la amebiasis humana.

Al evaluar la presencia de las amebas entre los dos grupos estudiados, destaca que *E. histolytica* solo fue detectada en el grupo de niños con diarrea y no en el grupo control. *E. dispar* quien ha sido considerada principalmente como una especie no patógena, si se encontró en ambos grupos de estudio, aunque en porcentajes diferentes. El único caso de *E. moshkovskii* encontrado, también fue detectado en el grupo de niños con diarrea (grupo de casos).

A pesar de ser inferior el número de individuos estudiados en el grupo control, es importante la presencia de *E. histolytica* solo en el grupo de casos. Si bien la



literatura refiere la posibilidad de individuos asintomáticos con *E. histolytica* (portadores asintomáticos) (35-37), en la presente investigación no se detectó esta situación, pues todos los pacientes infectados, presentaban diarrea. Es innegable la capacidad patogénica de *E. histolytica*, la cual se ha demostrado en múltiples publicaciones (38-41) y en este caso la coincidencia del hallazgo del parásito y la diarrea confirman esta premisa. Samie y col. (19) refieren que solo *E. histolytica* estuvo asociada estadísticamente con diarrea al efectuar un estudio sobre la distribución de *Entamoeba* en comunidades rurales de Sur África. La presencia de diarrea en los niños infectados por *E. dispar* y *E. moshkovskii* pudiese explicarse por la asociación con otros enteroparásitos que si producen diarrea (ej.: *G. lamblia*), situación observada en esta investigación.

Estudios realizados por Ugboko y col. (42) indican que las enfermedades diarreicas parasitarias de importancia para la salud pública son la amebiasis (*Entamoeba histolytica*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp) y giardiasis (*G. lamblia*), esto puede evidenciarse por el predominio de las amebas estudiadas en el grupo de niños con diarrea, a pesar de que no todas las amebas identificadas son consideradas patógenas.

Mediante examen microscópico solo se observaron 4 muestras positivas al complejo *Entamoeba*, todos ubicados en el grupo de preescolares. Una vez efectuado el procesamiento por RCP se logró evidenciar un mayor número de casos, resultando positivos 9 niños, detectándose casos de estas amebas tanto en el grupo de lactantes mayores (1%) como en el de lactantes menores (1%); además de algunos casos más dentro de los mismos preescolares. Esto era predecible pues la detección del ADN parasitario mediante RCP es mucho más sensible que la microscopía (3,8,27,33).

En cuanto a la presencia de las amebas estudiadas por edad, en forma general se encontró un predominio en el grupo de los preescolares, al detectarse 3% para *E. histolytica* y 4% para *E. dispar*. Sin embargo, no se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre las variables.

Los resultados de esta investigación difieren de la realizada por Rivero y col. (14) en individuos de una comunidad del estado Zulia; donde no existieron casos de estas amebas en los menores de 2 años, lo que pudiera explicarse debido a los cuidados maternos que reciben estos niños, así como al efecto protector contra *E. histolytica* que confieren el calostro y la leche materna a los lactantes (43,44).

Se observó una total congruencia de los resultados microscópicos del complejo *Entamoeba*, con los resultados de RCP. Los 4 casos detectados del complejo mediante microscopía fueron positivos a su vez por RCP, resultando en 2 casos de *E. histolytica* y 2 casos de *E. dispar*. Por supuesto, al ser la RCP un método más sensible y específico, logró detectar 5 casos más de estas amebas, que no habían sido diagnosticados mediante examen microscópico. Esto resultó diferente a lo referido por Bracho y col. (18) quienes no observaron coincidencia entre los resultados del examen directo de heces y los resultados por RCP en niños del SAHUM. En el estudio citado, mediante examen microscópico ningún paciente fue detectado con *Entamoeba histolytica/dispar*; mientras que mediante RCP, 8 muestras amplificaron para alguna de las especies de amebas, los autores consideran factible que las formas evolutivas de dichas amebas estuviesen en muy baja cantidad o parcialmente destruidas, por lo que no pudieron ser detectadas mediante microscopía y si mediante RCP, que es una técnica mucho más sensible. Aunque se encontraron las especies de amebas aquí estudiadas en los individuos pertenecientes a los estratos de pobreza relativa y pobreza crítica, el mayor porcentaje (6 casos) se encontró en el estrato de pobreza crítica. Esto permite

relacionar la presencia de estas amebas y principalmente la ameba patógena (*E. histolytica*), con las peores condiciones de la vivienda, los ingresos más bajos y el menor grado de instrucción de los padres de familia. Se hace hincapié principalmente en las condiciones de la vivienda, ya que son las más relacionadas a condiciones sanitarias y en la escala de Graffar para pertenecer al estrato V, el tipo de vivienda donde reside el encuestado era: Rancho o condiciones sanitarias marcadamente inadecuados. Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas tanto a nivel nacional como internacional (25,34,45-47), donde refieren que los parásitos intestinales están asociados principalmente a las malas condiciones higiénicas, escaso saneamiento del entorno y bajas condiciones socioeconómicas por parte del representante de la familia.

En conclusión, predominó la especie *E. dispar* entre los niños estudiados; sin embargo, los casos de *E. histolytica* se detectaron solo dentro del grupo de niños con diarrea y que a su vez pertenecían al estrato de pobreza crítica. Además, se encuentra la primera evidencia de infección por *E. moshkovskii* en humanos en Venezuela, lo que promueve la realización de investigaciones similares en otras comunidades.

### **Agradecimientos**

A la Dra. Nancy Guillen, del Instituto Pasteur en Paris, Francia; ya que todos los primers utilizados en la presente investigación fueron donados por ellos. Al Dr. Graham Clark del London School of Hygiene & Tropical Medicine, por donar las cepas control de referencia.

### **Conflicto de intereses**

Los participantes del proyecto manifiestan no presentar conflicto de intereses, ni ninguna relación económica, personal, política, interés financiero ni académico, que pueda influir en nuestro juicio.

## Financiamiento

Este proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, bajo el número CONDES-0490-13.

## Referencias

1. **Rios-Uil J, Mercadillo-Pérez P, Yuil de Rios E, Rios-Castro M.** Amebiasis Cutanea. Conceptos Actuales. Rev Med Hosp Gen Mex. 2012;75:114-22.
2. **Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L.** Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. Infec Genet Evol. 2019;75:104018  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104018>
3. **Carrero J, Reyes-López M, Serrano-Luna J, Shibayama M, Unzueta J, León-Sicairos N, et al.** Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. Int J Med Microbiol. 2020;310:151358. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
4. **Ngobeni R, Samie A, Moonah S, Watanabe K, Petri WA, Gilchrist C.** *Entamoeba* species in South Africa: correlations with the host microbiome, parasite burdens, and first description of *Entamoeba bangladeshii* outside of Asia. J Infect Dis. 2017; 216:1592-600. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix535>
5. **Foda AA, El-Malky MM.** Prevalence of genital tract infection with *Entamoeba gingivalis* among copper T 380A intrauterine device users in Egypt. Contraception 2012;85:108-12. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2011.04.006>
6. **Levecke B, Dorny P, Vercammen F, Visser LG, Van Esbroeck M, Vercruyse J, et al.** Transmission of *Entamoeba nuttalli* and *Trichuris trichiura* from nonhuman primates to humans. Emerg Infect Dis. 2015;21:1871-2.  
<https://doi.org/10.3201/eid2110.141456>
7. **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis Humanas. 4<sup>ta</sup> Edición. Medellín: Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas; 2012. p. 725.

8. **Najafia A, Mirzaeia A, Kermanjania A, Abdia J, Ghaderic A, Naserifara R.**

Molecular identification of *Entamoeba histolytica* from stool samples of Ilam, Iran.

Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;63:145-7.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.01.003>

9. **Rivero de Rodríguez Z.** Detección de *Entamoeba moshkovskii* en humanos: un nuevo problema diagnóstico en la amebiasis. Kasmera. 2013;41:42-9.

10. **Gilchrist CA.** *Entamoeba bangladeshi*: An insight. Trop Parasitol. 2014;4:96-8.

<https://doi.org/10.4103/2229-5070.138536>

11. **Quintero R.** Crecimiento y desarrollo psicológico al niño venezolano.

Puericultura Atención Primaria en Salud infanto-juvenil. Maracaibo: Ediciones Psicopediátricas; 2001. p. 7-10.

12. **Méndez H, De Méndez MC.** Sociedad y Estratificación: Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Editor Fundacredesa; 1994. p. 206.

13. **Melvin D, Brooke M.** Métodos de laboratorios para el diagnóstico de parasitosis intestinales. México: Editorial Interamericano; 1971. p. 198.

14. **Rivero Z, Bracho A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, et al.**

Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del Estado

Zulia, Venezuela. Cad Saúde Pública. 2009;25:151-9. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000100016>

15. **Khairnar K, Parija S.** A novel nested multiplex polymerase Chain Reaction

(PCR). Assay for differential detection of *E. histolytica*, *E. dispar* and *moshkovskii*

DNA in stool samples. BMC Microbiol. 2007;7:47. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-47>

16. **Ngui R, Angal L, Fakhurrazi S, Ai Lian Y, Ling L, Ibrahim J et al.**

Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba*

*moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. Parasit Vectors. 2012;5:187. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-187>

17. **Wayne D.** Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.

Cuarta Edición. **Incluir ciudad de publicación:** Limusa Wiley; 2002. p. 665.

18. **Bracho A, Rivero de Rodríguez Z, Arraiz N, Villalobos R, Urdaneta H.**

Detección de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante PCR, en niños menores de cinco años con diarrea, en Maracaibo, Venezuela: Estudio preliminar.

Invest Clin. 2013;54:373-81.

19. **Samie A, Mahlaule L, Mbatl P, Nozaki T, ElBakri A.** Prevalence and distribution

of *Entamoeba* species in a rural community in northern South Africa. Food

Waterborne Parasitol. 2020;18:e00076. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00076>

20. **Sharbatkhori M, Nazemalhosseini-Mojarad E, Cheraghali F,**

**Maghsoodloorad FS, Taherkhani H, Vakili MA.** Discrimination of *Entamoeba* Spp.

in children with dysentery. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2014;7:164-7.

21. **López O, López M, Corredor V, Echeverri C, Pinilla A.** Differentiation of

*Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar* using Gal/GalNAc-lectin and

polymerase chain reaction. Rev Med Chile. 2012;140:476-83.

<https://doi.org/10.4067/S0034-98872012000400008>

22. **Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJ, Santos JP, Toma HK, Gomes TF, et al.**

Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water

scarcity in northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111:114-9.

<https://doi.org/10.1590/0074-02760150383>

23. **Abid T.** Molecular identification of some species of *Entamoeba* isolated from

patients with diarrhea in Afak city/Qadisiyah governorate using real-time PCR

technique. Int J Recent Sci Res. 2016;7:11207-11.

24. **Bahrami F, Haghighi A, Zamini G, Khademerfan M.** Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in faecal samples using nested multiplex PCR in west of Iran. *Epidemiol Infect.* 2019;147:E96. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000141>
25. **Saidin S, Abu Bakar A, Mohd Zain BM.** Prevalence and associated risk factors of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii* infection among Orang Asli communities in Slim River, Perak. *JSML.* 2020;8:22-35.
26. **Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H.** Estudio epidemiológico y molecular de cepas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en pacientes con diarrea en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. *Invest Clin.* 2008;49:225-37.
27. **Roshdy MH, Abd El-Kader NM, Ali-Tammam M, Fuentes I, Mohamed MM, El-Sheikhand NA, et al.** Molecular diagnosis of *Entamoeba* spp. versus microscopy in the Great Cairo. *Acta Parasitol.* 2017;62:188-91. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0022>
28. **Haque R, Ali I, Clark C, Petri W.** A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladesh child. *Parasitol Inter.* 1998;47:201-2.
29. **Ali IKM, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri Jr W, Haque R, et al.** *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:580-4. <https://doi.org/10.3201/eid0905.020548>
30. **Levecke B, Dreesen L, Barrionuevo-Samaniego M, Ortiz WB, Praet N, Brandt J, et al.** Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105:737-9. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.010>
31. **Bachkanji AB.** Identificación molecular de especies de *Entamoeba* en muestras fecales provenientes de pacientes del anexo pediátrico del “Hospital Luis Razetti” de

Barcelona, Estado Anzoátegui y su relación con síntomas clínicos. [Disertación].

Anzoátegui: Universidad de Oriente; 2011.

32. **López M, León C, Fonseca J, Reyes P, Moncada L, Olivera M, et al.** Molecular epidemiology of *Entamoeba*: First description of *Entamoeba moshkovskii* in a rural area from central Colombia. PlosOne. 2015;14:1-11

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140302>

33. **Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, De Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA, et al.** A cross-sectional study of *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* complex in Salvador, Bahia, Brazil. Biomed Res Int. 2019;2019:7523670.

<https://doi.org/10.1155/2019/7523670>

34. **Ngui R, Hassan N, Soffyan N, Mohd-Shaharuddin N, Chang Li Y, Shuan C, et al.** Copro-molecular study of *Entamoeba* infection among the indigenous community in Malaysia: A first report on the species-specific prevalence of *Entamoeba* in dogs, Acta Tropica. 2020; 204:105334. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105334>

35. **Castro AA, Bacalhau F, Silva FF, Avillez C, Batalheiro J.** *Entamoeba histolytica* como causa de diarreia crônica. Rev Bras Med Fam Comunidade. 2019;14:1917. [https://doi.org/10.5712/rbmfc14\(41\)1917](https://doi.org/10.5712/rbmfc14(41)1917)

36. **Aguilar-Solis BE, Sánchez-Rodríguez A, Sael Lima M, Álvarez-Trejo VE.** Amebiasis vulvar. Dermatol Rev Mex. 2017;61:142-6.

37. **Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, et al.** Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. J Clin Microbiol. 2003;41:4745-50. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4745-4750.2003>

38. **Andrade A, Santana T.** *Entamoeba histolytica* como causa da amebíase. Rev Saúde Meio Ambiente. 2020;10:133-9



39. **Aguilar-Rojas A, Castellanos-Castro S, Matondo M, Giai Q, Varet H, Sismeiro O, et al.** Insights into amebiasis using a human 3D-intestinal model. *Cell Microbiol.* 2020;22:e13203. <https://doi.org/10.1111/cmi.13203>
40. **Hernández C, Moreno J, Olarte M, Meza E, Regalado J.** Amebiasis intestinal: infección que prevalece. *Ibn Sina.* 2020;11:1-11.
41. **Saavedra E, Olivos A.** Amebiasis. *Ciencia.* 2017;68:14-7.
42. **Ugboko HU, Nwinyi OC, Oranusi SU, Oyewal JO.** Childhood diarrhoeal diseases in developing countries. *Heliyon.* 2020;6:e03690  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03690>
43. **Haque R, Mondai D, Kirkpatrick B, Akter S, Farr B, Sack B, et al.** Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in a urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:398-405.
44. **Akisu C, Aksoy U, Cetin H, Ustun S, Akisu M.** Effect of human milk and colostrum on *Entamoeba histolytica*. *World J Gastroenterol.* 2004;10:741-2.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i5.741>
45. **Devera R, Aguilar K, Maurera R, Blanco Y, Amaya I y Velásquez V.** Parasitosis Intestinales en Alumnos de la Escuela Básica Nacional:” San José de Cacahual”. San Félix, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Academia.* 2016;15:35-46.
46. **Cociancica P, Torrusio S, Zonta ML, Navone G.** Risk factors for intestinal parasitoses among children and youth of Buenos Aires, Argentina. *One Health.* 2020;9:100116 <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100116>
47. **Gholipoor Z, Khazan H, Azargashb E, Youssefi M, Rostami A.** Prevalence and risk factors of intestinal parasite infections in Mazandaran province, North of Iran. *Clin Epidemiol Global Health* 2020;8:17-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.cegh.2019.03.010>

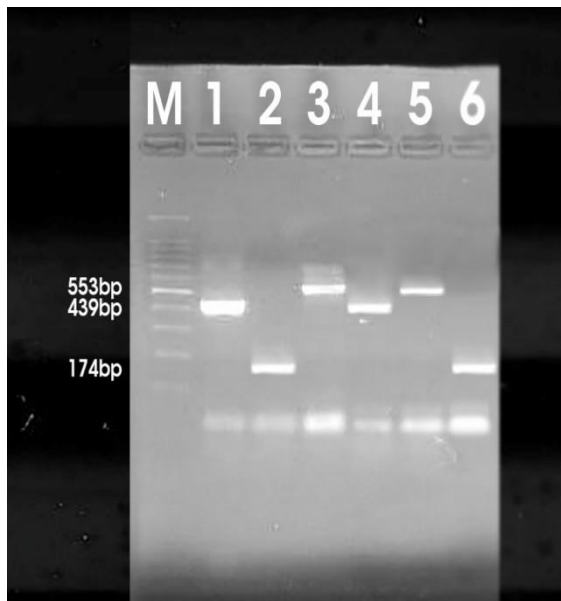


Fig. 1. Muestra la Identificación por PCR de *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*. M- Marcador de peso molecular 1- Control de referencia de *E. histolytica* (HM-1: IMSS); 2- Control de referencia de *E. dispar* (SAW 760); 3.- Control de referencia de *E. moshkovskii* (cepa Laredo). 4,5,6- ADN extraído de muestras de heces de pacientes, que resultaron positivos a cada una de las amebas estudiadas.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos iniciadores utilizados para las especies *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

| Parásito                 | Nombre del primer | Secuencia del primer (5' a 3') | Tamaño del producto (pb) |
|--------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <i>Entamoeba</i><br>spp. | E-1               | TAAGATGCAGAGCGAAA              | Aprox. 800               |
|                          | E-2               | GTACAAAGGGCAGGGACGTA           |                          |
| <i>E. moshkovskii</i>    | Mos-1             | GAAACCAAGAGTTTCACAAC           | 553                      |
|                          | Mos-2             | CAATATAAGGCTTGGATGAT           |                          |
| <i>E. histolytica</i>    | EH-1              | AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG         | 439                      |
|                          | EH-2              | AAGAGGTCTAACCGAAATTAG          |                          |
| <i>E. dispar</i>         | ED-1              | TCTAATTTTCGATTAGAACTCT         | 174                      |
|                          | ED-2              | TCCCTACCTATTAGACATAGC          |                          |

**Cuadro 2.** Resultados de la técnica de RCP por especie de *Entamoeba* en grupo de casos y control.

| Especies Parasitarias        | Grupo estudiado |            |               |            |
|------------------------------|-----------------|------------|---------------|------------|
|                              | Grupo de Casos  |            | Grupo Control |            |
|                              | n               | %          | n             | %          |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 3               | 37,5       | 0             | 0          |
| <i>Entamoeba dispar</i>      | 4               | 50,0       | 1             | 100        |
| <i>Entamoeba moshkovskii</i> | 1               | 12,5       | 0             | 0          |
| <b>Total</b>                 | <b>8</b>        | <b>100</b> | <b>1</b>      | <b>100</b> |