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

Ángela Bracho Mora¹, Zulbey Rivero de Rodríguez¹, Nailet Arraiz¹, Rafael Villalobos² y Haydee Urdaneta³.

¹Escuela de Bioanálisis, ²Escuela de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

³Instituto de Inmunología Clínica. Universidad del Los Andes (IDIC-ULA). Mérida, Venezuela.

Palabras clave: niños, diarrea, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR.

Resumen. Para determinar la prevalencia de *Entamoeba histolytica* como productora de diarrea, se realizó un estudio en niños menores de cinco años con diarrea que asistieron a diversas consultas del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. A las muestras de heces obtenidas, se les realizó examen macroscópico, microscópico con solución salina fisiológica 0,85% y lugol, así como coloración de Kinyoun. El resto de la muestra se congeló hasta la extracción del ADN y luego se amplificaron mediante PCR separadas para *E. histolytica* y *E. dispar*. De las 50 muestras analizadas mediante examen microscópico, ninguna presentó trofozoítos y/o quistes de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, ni coccidios intestinales. Los parásitos detectados fueron *Giardia lamblia* (6%), *Blastocystis* sp. (6%), *Pentatrichomonas hominis* (2%), *Ascaris lumbricoides* (2%) y *Trichuris trichiura* (2%). Mediante PCR, 6 muestras (12%) presentaron ADN de *E. dispar* y 2 (4%) ADN de *E. histolytica*. Ningún niño presentó asociación de ambas amibas. Los dos niños que presentaron *E. histolytica* tenían 1 año de edad. *E. dispar* si fue detectada en niños de menor edad. Se sugiere que la prevalencia de *E. histolytica* en niños menores de cinco años con diarrea es realmente baja.

Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by PCR in children, less than five years of age with diarrhea, in Maracaibo, Venezuela. A preliminary study.

Invest Clin 2013; 54(4): 373 - 381

Keywords: children, diarrhea, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR.

Abstract. To determine the prevalence of *Entamoeba histolytica* as a producer of diarrhea, a study was conducted in children, less than five years of age, with diarrhea who attended several out patient clinics of the Servicio Autónomo Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela. A macroscopic and microscopic examination with physiological saline, lugol and Kinyoun staining were performed to the stool samples obtained. The remainder of the sample was frozen until DNA extraction, and PCR amplification was performed separately for *E. histolytica* and *E. dispar*. Microscopic examination showed no trophozoites and/or cysts of *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, or intestinal coccidians in any of the 50 samples analyzed. Parasites detected were *Giardia lamblia* (6%), *Blastocystis* sp. (4%), *Pentatrichomonas hominis* (2%), *Ascaris lumbricoides* (2%) and *Trichuris trichiura* (2%). By PCR, six samples (12%) had DNA of *E. dispar* and two (4%) had DNA from *E. histolytica*; no child showed association of both amoebae. The two children who had *E. histolytica* were one-year-old. *E. dispar* was detected in younger children. We suggest that the prevalence of *E. histolytica* in children under five years is really low.

Recibido: 12-06-2013 Aceptado: 31-10-2013

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública en el mundo, especialmente en países en desarrollo, donde representan una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años. Múltiples episodios de diarrea en el primer año de vida pueden deteriorar el estado nutricional y causar graves secuelas en el niño. Las características epidemiológicas, agentes etiológicos y presentación clínica de las diarreas son muy variables dependiendo del país, región y comunidad, por lo que su conocimiento es esencial para el diseño de programas de prevención y control (1).

La etiología de las diarreas no está completamente determinada en Venezuela, debido a que la causa de esta enfermedad no se estudia en detalle, sino que en general, se refiere el número de casos clínicos con la patología y los grupos de edad afectados. Sin embargo, la mayoría de los estudios efectuados para determinar la etiología de las diarreas agudas en niños menores, señalan que la mayor frecuencia corresponde a infecciones virales, en segundo lugar bacterias enteropatógenas y en tercer lugar los parásitos. Los parásitos patógenos más frecuentemente involucrados son *G. lamblia*, *Cryptosporidium* sp., y *Entamoeba histolytica*, este último, agente etiológico de la amibiasis (1-3).

Según la Dirección Regional de Epidemiología del Edo. Zulia (4), para el año 2008 las diarreas constituyeron la tercera causa de morbilidad en consulta ambulatoria del estado y la segunda para el municipio Maracaibo. En el mismo reporte se señalan 25.402 casos de amibiasis y 53.281 casos de diarreas en niños de 1-4 años.

El diagnóstico rutinario de la amibiasis se realiza mediante examen coprológico, a través de la observación microscópica de quistes y/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 *Entamoeba dispar* y recientemente la detección de *Entamoeba moshkovskii* en seres humanos ha complicado el diagnóstico microscópico de laboratorio (5), ya que, *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* son morfológicamente idénticas, pero diferentes desde el punto de vista genético y bioquímico (5-8), considerándose además a estas dos últimas como amibas no patógenas (9).

Por todo esto, el examen microscópico del material fecal presenta ahora serias limitaciones, siendo la más importante de ellas, la incapacidad de distinguir entre *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, donde solo puede confirmarse la presencia de *E. histolytica* cuando las muestras presentan trofozoítos hematófagos (10), situación que es bastante infrecuente. La detección de la lectina de galactosa y N acetil galactosamina (Gal/GalNAc-lectina) en materia fecal mediante la técnica de ELISA y la amplificación por PCR de fragmentos específicos de ADN genómico sí permiten identificar las especies (11), las cuales son técnicas que por su alto costo y/o condiciones de infraestructura especiales, no se realizan en los laboratorios de rutina de nuestro país.

Debido al escaso número de investigaciones realizadas en el país que señalen la verdadera prevalencia de *E. histolytica* en

niños con diarrea y la inexistencia de información al respecto en nuestra región, se realiza la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio, población y muestra

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, descriptivo en niños menores de cinco años de edad, de ambos sexos que asistieron a diversos servicios, Emergencia Pediátrica, Triage Pediatría, UCAIEPI (Unidad de Cuidados de Atención Integral de las Enfermedades Prevalentes en la Infancia) del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), desde Octubre hasta Diciembre del año 2009. Se limitó a 50 el número de individuos participantes en el estudio, en virtud de los costos que representaba la prueba de PCR. Se escogieron como muestra, los 50 niños que en dicho periodo de tiempo cumplieren con el criterio de inclusión requerido: menores de 5 años, de ambos sexos, con síndrome diarreico, que fuesen asistidos en los servicios mencionados. Así mismo, se les explicó a los padres y/o representantes los beneficios de participar en el estudio y así obtener el consentimiento firmado. Los padres o tutores legales de todos los pacientes pediátricos dieron su consentimiento informado por escrito según las Normas del Código de Bioética y Bioseguridad (12).

Diagnóstico de laboratorio

Se solicitó una muestra de heces por niño, recolectada en envase plástico, limpio y seco, identificado con el nombre, edad y sexo del paciente. Se realizó en primer término, el examen macroscópico y microscópico de las heces con solución salina fisiológica al 0,85% y coloración de lugol. Es importante resaltar que fue imposible realizar técnicas de concentración, debido a la insuficiente cantidad de muestra recibida, pues una porción de la misma debía ser sometida

a otras determinaciones coproquímicas (resultados no mostrados aquí). Con una porción de la muestra se realizó un frotis coloreado con Kinyoun (13), con la finalidad de detectar la presencia de coccidios intestinales. Otra porción de la muestra se mantuvo congelada a -20°C , hasta su procesamiento por PCR. Posteriormente, fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino Metabólicas (CIEM) perteneciente a la Facultad de Medicina de LUZ, donde se realizaron las PCR separado para *E. histolytica* y *E. dispar*, según procedimiento descrito por Rivero y col. (10). No se realizó la detección de *E. moshkovskii*, pues para la fecha no se disponía de *primers*, ni control positivo para dicha determinación.

Análisis estadístico

Se definieron grupos etarios en base a la clasificación de Masalán y González (14). Los resultados fueron expresados en número y porcentajes, se determinó el promedio de la edad, además se realizó la prueba de Ji-cuadrado (χ^2) y prueba exacta de Fisher cuando correspondiese, para comparar variables cualitativas. Se tomó el 95% como índice de confiabilidad, con un nivel de significancia $p \leq 0,05$; utilizando el programa SPSS versión 10.0 para Windows.

RESULTADOS

Se recolectaron las muestras fecales de 50 niños con diarrea. La mediana de la edad fue de 1 año (12 meses) y la DS de $\pm 9,6$ meses, participaron 26 varones y 24 hembras. La prevalencia general de parásitos, fue del 24% (12/50), donde 7 (58,3%) eran varones y 5 (41,6%) hembras. El poliparasitismo fue del 25%, representado por 3 niños, siendo el máximo número de asociaciones detectadas, de 4 parásitos.

Los parásitos diagnosticados mediante microscopía se evidencian en la Tabla I:

TABLA I
PREVALENCIA DE ENTEROPARÁSITOS*
MEDIANTE EXAMEN MICROSCÓPICO,
EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS
CON DIARREA DE MARACAIBO, VENEZUELA

Especie Parasitaria	Nº Casos	%
<i>Giardia lamblia</i>	3	6
<i>Blastocystis</i> sp.	3	6
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	1	2
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	2
<i>Trichuris trichiura</i>	1	2

*Incluidas las asociaciones parasitarias.
 $\chi^2 = 0,000$. GL: 4. No hay diferencia significativa.

Giardia lamblia (6%), *Blastocystis* sp. (6%), *Pentatrichomonas hominis* (2%), *Ascaris lumbricoides* (2%) y *Trichuris trichiura* (2%). Ningún paciente presentó trofozoítos y/o quistes de *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*, ni se observaron coccidios intestinales.

En las Figs. 1 y 2 se observan los resultados del PCR donde 6 muestras (12%) presentaron ADN de *E. dispar* y 2 (4%) ADN de *E. histolytica*, ningún niño presentó asociación de ambas amibas.

El mayor número de niños estudiados (24), se encontraba en el estrato de 1 a 11 meses (lactante menor), donde el niño más pequeño infectado por las amibas tenía un mes de nacido y portaba *E. dispar*. Solo se detectó *E. histolytica* en niños de 12 a 23 meses (lactantes mayores: 8,3%). No se determinó diferencia significativa entre la prevalencia de las amibas estudiadas según edad ni sexo, aunque el bajo número de individuos estudiados no permite hacer mayores conclusiones al respecto.

DISCUSIÓN

Según la OMS (15), la amibiasis afecta anualmente a 40-50 millones de personas y supone alrededor de 100.000 muertes anua-

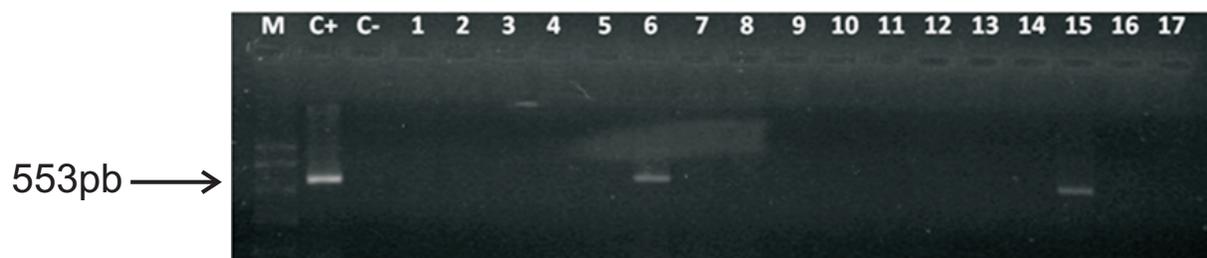


Fig. 1. Identificación por PCR de *E. histolytica*. M: marcador de peso molecular; C+: control de referencia de *E. histolytica* (SrpEh 5/3); C-: control negativo; carriles 1 al 17: ADN extraído de muestras de heces de pacientes. Se observa fragmento de 553 pb en 2 de 50 muestras analizadas (carriles 6 y 15).



Fig. 2. Identificación por PCR de *E. dispar*. M: marcador de peso molecular; C+: control de referencia de *E. dispar* (SrpED 5/3); C-: control negativo; carriles 1 al 17: ADN extraído de muestras de heces de pacientes. Se observa fragmento de 567 pb en 6 de las 50 muestras analizadas (carriles 3, 4, 8, 10 y 13).

les. La prevalencia mundial de la amibiasis está sobreevaluada actualmente, en virtud de que el diagnóstico de laboratorio que se realiza en la mayoría de los países no distingue entre *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*; por lo que las cifras obtenidas incluyen a las tres amibas. En la medida que los diagnósticos clínicos de amibiasis sean confirmados o rechazados en base a resultados obtenidos mediante pruebas de laboratorio que señalen específicamente a la amiba implicada, la prevalencia de la amibiasis disminuirá en forma importante.

En la literatura (3, 16-18) las cifras de prevalencia de *E. histolytica* varían notablemente en los últimos años debido a varios factores. Entre ellos, la redescipción formal de *E. dispar* como especie diferente a *E. histolytica*; la detección de *E. moshkovskii* en humanos y variaciones debidas a las técnicas utilizadas para el diagnóstico de

las amibas. Sin embargo, en investigaciones latinoamericanas donde se han utilizado técnicas discriminatorias, los valores de prevalencia de *E. histolytica* y de *E. dispar* no superan el 30%. En Colombia, se realizaron estudios puntuales para diferenciar estas dos especies mediante ELISA para la detección de la Gal/GalNAc-lectina en materia fecal; las frecuencias relativas comunicadas, fueron de 0,6-1,4% para *E. histolytica* y de 15-17% para *E. dispar* (19, 20). En Nicaragua refieren una prevalencia para *E. histolytica* de 1,5% y para *E. dispar* 7,5% (21). En México han reportado 11,4% de prevalencia para *E. histolytica*, 7,2% para *E. dispar* y 2,4% para ambas especies de amibas (22).

En otros continentes las cifras son variables. Un trabajo reciente realizado en los Emiratos Arabes (23) utilizando nested PCR, señala un 13,3% de prevalencia de *E.*

histolytica, 6,6% de *E. dispar* y 3,3% de *E. moshkovskii*. Un estudio realizado en comunidades rurales de Malasia (8) mostró que la infección con *E. histolytica* (75,0%) fue la más común, seguida de *E. dispar* (30,8%) y *E. moshkovskii* (5,8%). De estos, 63,5% de los individuos presentaban solo *E. histolytica*, 19,2% portaban *E. dispar* y 3 (5,8%) solo *E. moshkovskii*.

En Venezuela, los estudios realizados mediante técnicas moleculares para diferenciar estas especies de *Entamoeba* (*E. histolytica* de *E. dispar*) son escasos. En 2008, Mora y col. (24), realizaron un estudio en Cumaná donde reportan una prevalencia para *E. histolytica* de 6,3% y para *E. dispar* 4,4% mediante PCR, en pacientes con diarrea. Rivero y col. (10) refieren un total de 47 casos positivos a estas amibas mediante PCR en Maracaibo; de los cuales 10,7% eran portadores de *E. histolytica*, 7,8% de *E. dispar* y 4,4% presentaron infección mixta por ambos parásitos.

En cuanto a la prevalencia de estas amibas en niños, en nuestra región son bajas si las comparamos con otros resultados en el país, como los de Rodulfo y col. (25); quienes mediante una técnica de nested PCR, refieren prevalencias de 19,3% para *E. histolytica*, 4% para *E. dispar* y 4,7% de infecciones mixtas en niños 0 a 10 años de Barcelona, Venezuela. Los resultados aquí obtenidos se asemejan más a los de Haque y col. (26), quienes reportan en niños de Bangladesh, 4,2% de prevalencia para *E. histolytica* y 6,5% de *E. dispar* en niños del área urbana; mientras que en los del área rural observaron 1% de *E. histolytica* y 7% de *E. dispar*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, señalan bajos porcentajes de *E. histolytica* (4%) en niños menores de 5 años que incluso presentaban cuadro diarreico, lo cual desmiente en cierta medida, el mito de que la amibiasis es sumamente frecuente en niños, principalmente en lac-

tantes. Apoyando esta premisa, podemos citar un estudio realizado en el estado Bolívar (27), donde se refiere la ausencia de *E. histolytica/dispar* en niños de dicha entidad y aunque no se usaron técnicas específicas para discriminar entre estas amibas, es destacable que ellas estén ausentes, considerando que los niños estudiados pertenecían al nivel socioeconómico medio, medio-bajo y bajo, donde existe mayor riesgo de transmisión. Aunque el número de individuos estudiados fue bajo (50 individuos) se utilizó una técnica altamente sensible y específica para el diagnóstico de la parasitosis, por lo que los resultados son importantes. Fue más elevada la prevalencia de *E. dispar* (12%) que la de *E. histolytica*, situación que ha sido referida por otras investigaciones en población general a nivel mundial (19-22) y consideramos que la condición parece presentarse de igual forma en niños.

No se observó coincidencia entre los resultados del examen directo de heces y los resultados por PCR, ya que mediante examen microscópico ningún paciente fue detectado con *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovski*; mientras que mediante PCR, 8 muestras amplificaron para alguna de las especies de amibas. Consideramos factible que las formas evolutivas de dichas amibas estuviesen en muy baja cantidad o parcialmente destruidas, por lo que no pudieron ser detectadas mediante microscopía y si mediante PCR, que es una técnica mucho más sensible.

El examen directo de la muestra fecal con solución salina fisiológica 0,85% y lugol por microscopía de luz, ha sido el procedimiento de primera línea para el diagnóstico de la amibiasis y otras parasitosis intestinales humanas, sin embargo, puede conducir a falsos negativos y positivos. Los falsos negativos pueden deberse a retrasos en el procesamiento de la muestra fecal (que provoca la alteración y destrucción de las formas evolutivas parasitarias); corto tiempo de re-

visión microscópica de la muestra y escasa experiencia del personal encargado de la revisión. Los falsos positivos en el diagnóstico de laboratorio, generalmente se deben a la confusión entre macrófagos y trofozoítos amebianos, así como entre polimorfonucleares y quistes o con los quistes de otras amibas (Ej: *E. coli*, *E. hartmanni*), de allí la baja especificidad de este tipo de examen, lo que conlleva a una incorrecta identificación de las amibas (26, 28). Por este motivo se requiere de una alta experiencia y entrenamiento del profesional que ejecuta el diagnóstico.

En cuanto a la presencia de diarrea aún en niños que portaban *E. dispar*, es necesario aclarar que un niño portador de esta amiba también presentó *G. lamblia*, lo que podría explicar la diarrea observada. Del resto de los niños parasitados con estas amibas, solo uno que portaba *E. histolytica*, también presentó *Blastocystis* sp. Sin embargo, en la literatura existen reportes de *E. dispar*, *E. histolytica* e infecciones mixtas en individuos con síntomas gastrointestinales siendo la diarrea uno de las principales manifestaciones encontradas (25). En el mismo contexto, el resto de los casos con diarrea, podrían deberse a algún agente bacteriano o viral que lamentablemente no pudo ser diagnosticado al no incluirse en esta investigación, coprocultivos ni pruebas para rotavirus ni adenovirus.

En general, las infecciones causadas por protozoarios intestinales predominaron en los niños estudiados. El poliparasitismo fue infrecuente, sobre todo en los tres primeros grupos etarios estudiados, lo que puede comprenderse por los cuidados maternos que estos niños reciben. Mediante examen microscópico, los parásitos más prevalentes fueron *G. lamblia* y *Blastocystis* sp. con 6% cada uno. *G. lamblia* siempre ha sido referido como uno de los microorganismos más frecuentes en niños con diarrea (5, 29, 30). En países en vías de desarrollo,

G. lamblia afecta entre un 20 a un 30% de la población, siendo los niños menores de 5 años los más afectados, debido a sus hábitos poco higiénicos (30). *Blastocystis* sp., aunque es considerado ahora taxonómicamente como un cromista, sigue siendo el microorganismo más frecuentemente observado en la muestras fecales humanas de individuos de todas las edades (17, 18, 31, 32), la infección por este microorganismo no parece restringirse a condiciones climáticas, grupos socioeconómicos ni áreas geográficas.

Desde el punto de vista epidemiológico, la amibiasis es más frecuente en los países tropicales y en individuos con malas condiciones higiénico-sanitarias. A su vez estas condiciones están presentes en muchas comunidades de bajo estatus socioeconómico. Aunque en la presente investigación, no se realizó una encuesta socioeconómica a las familias de los niños incluidos en el estudio, al realizarse el muestreo en una institución pública, puede inferirse que los asistentes al hospital pertenecen a un estrato socioeconómico bajo. En base los resultados obtenidos, se sugiere que la prevalencia de *E. histolytica* en niños menores de cinco años con diarrea es realmente baja, aún en niños de bajo nivel socioeconómico. Son necesarias más investigaciones en relación a este tema, sobre todo en las que se evalúe a un número mayor de individuos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ivonne Qvamstrong del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de los Estados Unidos, por la donación de la cepa de *E. dispar*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urrestarazu M, Liprandi F, Pérez E. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Vene-

- zuela. Rev Panam Salud Pública 1999; 6:149-156.
2. **Larrosa-Haro A, Ruíz-Pérez M, Aguilar-Benavides S.** Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. Salud Pública Mex 2002; 44:328-334.
 3. **Manrique-Abril F, Billon D, Bello S, Ospina J.** Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. Rev Salud Pública 2006; 8:88-97.
 4. **Ministerio del Poder Popular para la Salud.** Anuario Epidemiológico de la Dirección de Epidemiología. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. 2008.
 5. **Hanzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P.** Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR Assay. J Clin Microbiol 2006; 44:3196-3200.
 6. **Clark CG, Diamond LS:** The Laredo strain and other '*Entamoeba histolytica* like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. Mol Biochem Parasitol 1991; 46: 11-18.
 7. **Ali IKM, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi P, Petri JWA, Haque R, Clark CG.** *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. Emerg Infect Dis 2003; 9:580-584.
 8. **Ngui R, Angal L, Fakhrurrazi S, Ai Lian Y, Ling L, Ibrahim J, Mahmud R.** Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. Parasit Vectors 2012; 5:187.
 9. **Chacín L.** Amibiasis: implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. Invest Clin 2010; 51:239-256.
 10. **Rivero Z, Bracho A, Chourio G, Díaz I, Calchi M, Acurero E, Maldonado A, Chourio G, Arraiz N, Corzo G.** Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en individuos de una comunidad del Estado Zulia, Venezuela. Cad Saúde Pública 2009; 25:151-159.
 11. **López O, López M, Corredor V, Echeverri MC, Pinilla A.** Diferenciación del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* mediante Gal/GalNAc-lectina y PCR en aislamientos colombianos. Rev Med Chile 2012; 140:476-483.
 12. **Briceño E, Pérez M, Aguilera M, Feliciangeli D, Godoy A.** Código de Bioética y Bioseguridad, Capítulo 1 y 2. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2008. 3ra. Edición. Venezuela.
 13. **Melvin D, Brooke M.** Métodos de laboratorio para diagnóstico de parasitosis intestinales. 1era ed. Editorial Interamericana. México-D.F. 1971.
 14. **Masalán M, González R.** Auto cuidado del ciclo vital. Disponible en: http://www7.uc.cl/sw_educ/enferm/ciclo/ Accesado: 18 de febrero de 2012.
 15. **WHO.** Amoebiasis. Report on the WHO/Pan American Health Organization/UNESCO Expert Consultation Mexico City Geneva_WHO. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72: 97-100.
 16. **Tanyuksel M, Petri W.** Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16:713-729.
 17. **Díaz I, Rivero Z, Bracho A, Castellanos M, Calchi M, Acurero E, Atencio R.** Prevalencia de enteroparásitos en niños de la etnia yukpa de Toromo, Edo. Zulia, Venezuela. Rev Méd Chile 2006; 134:72-78.
 18. **Amato V, Alarcón R, Gayika E, Ferreira S, Becerra C, Santos G.** Elevada porcentagem de Blastocistose em escolares de Sao Paulo SP. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37:354-356.
 19. **Guzmán C, López MC, Reyes P, Gómez J, Corredor A, Agudelo CA.** Diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en muestras de materia fecal por detección de adhesina de *E. histolytica* mediante ELISA. Biomédica 2001; 21:167-171.
 20. **Gallego M, Gómez JE, Torres E, Lora F.** Prevalencia de *E. histolytica* en asentamientos temporales posterremoto de la ciudad de Armenia. Infectio 2003; 7:190-194.
 21. **Leiva B, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E.**

- Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. Arch Med Res 2006; 37:529-534.
22. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, de León M del C, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. Exp Parasitol 2005; 110: 327-330.
 23. Elbakri A, Samie A, Ezzedine S, Odeh R. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE). Acta Parasitol 2013; 58: 185-190.
 24. Mora L, García A, De Donato M, Urdaneta H. Epidemiologic and molecular study of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* strains in patients with diarrhea in Cumana, Sucre state, Venezuela. Invest Clin 2008; 49:225-237.
 25. Rodolfo H, Ahmar B, Rodríguez ME, Mora L, De Donato M. Nested PCR reveals elevated over-diagnosis of *E. histolytica* in Barcelona, Venezuela. Invest Clin 2012; 53:365-377.
 26. Haque R, Faruque A, Hahn P, Lyerly D, Petri W. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997; 175:734-736.
 27. Devera R. Ausencia de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* en Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. Biomédica 1998; 9:145-150.
 28. González-Ruiz A, Haque R, Aguirre A. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. J Clin Pathol 1994; 47:236-239.
 29. Haque R, Mondai D, Kirkpatrick B, Akter S, Farr B, Sack B, Petri W. 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.
 30. Cañete R, González M, Almirall P, Figueroa I. Infección por *Giardia* y Giardiosis. Rev Panam Infectol 2004; 6:41-48.
 31. Devera R, Cermeño J, Blanco Y, Bello M, Guerra X, Sousa M, Maitan E. Prevalencia de Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en una comunidad rural del estado Anzoátegui, Venezuela. Parasitol Latinoam 2003; 58:95-100.
 32. Goldstein E, Coyle C, Varughese J, Weiss L, Tanowitz H. *Blastocystis*: To treat or not to treat. Clin Infect Dis 2012; 54:105-110.