

Artículo Original

Uso del péptido recombinante rCBP-C13 de *Entamoeba histolytica* como método diagnóstico de colitis amibiana

Bertha Jiménez-Delgadillo¹, Efrén Rubio-Losa¹, Ignacio Alberto Vado-Solís¹, Juan José Arias-León¹, Carlos Enrique Pérez-Osorio¹, Gaspar Fernando Gaspar-Peniche¹, Maria Fidelia Cárdenas-Marrujo¹.

¹Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán.

RESUMEN

Introducción. *Entamoeba histolytica* agente causal de la amibiasis, caracterizada por la destrucción de células, matriz extracelular, e invasión a tejidos del huésped por los trofozoitos. Las especies que infectan al hombre, incluyen la patógena e invasiva *E.histolytica* y las comensales *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*, indistinguibles morfológicamente. Las infecciones asintomáticas no invasivas se atribuyen ahora a *E.dispar*. La Organización Mundial de la Salud recomendó el desarrollo de métodos diagnósticos para distinguir la especie invasiva de las comensales y la reestimación de su distribución en la población mundial, por las implicaciones en el tratamiento, sobre todo de poblaciones marginadas y vulnerables infectadas que pudieran desarrollar una amibiasis invasiva sintomática. El gene EhCBP-C13 de *Entamoeba* codifica para una proteína de unión específica a colágena, que se encuentra presente en ambas especies, pero en *E. dispar* no se expresa mientras que en pacientes que cursan una infección amibiana hepática activa, se detectan títulos altos contra esta proteína. **Objetivo.** evaluar un método diagnóstico serológico para detectar infecciones amibianas invasivas (*E.histolytica*) mediante el péptido recombinante rEhCBP-C13, en un ensayo tipo ELISA. **Métodos.** El método rEhCBP-C13-ELISA, se contrastó con exámenes de observación microscópica directa (prueba estándar) y se analizó con base al índice de kappa para evaluar su correlación diagnóstica. **Resultados.** Se encontró una frecuencia de 18.2% y 24.2%, por examen de observación microscópica directa y por la prueba de ELISA, respectivamente. Se encontró una asociación entre el porcentaje de muestras positivas hacia la presencia de anticuerpos anti-rEhCBP-C13, y la presencia de sangre en heces ($p=0.0003$). Mediante un análisis kappa obtuvimos una proporción de concordancia relativa o esperada de $P_c = 0.663$ y una proporción de concordancia absoluta de $P_o = 0.939$. **Conclusión.** La proteína rEhCBP-C13 en este estudio mostró ser eficaz para el serodiagnóstico de infección por *E. histolytica* en personas con disentería amibiana.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, diagnóstico amibiasis, proteína de unión a colágena, colitis amibiana, Yucatán

ABSTRACT

Introduction. Amebiasis is caused by *Entamoeba histolytica*, and it is characterized by cell damage, disruption of the extracellular matrix in the host, and invasion to the tissues due to trophozoites of the parasite. Reclassification of amebas includes to *E. histolytica* – an invasive human pathogen, and the commensals *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii* –which are morphologically indistinguishable. Non-invasive asymptomatic infections are attributable to *E. dispar*. The World Health Organization has established research priorities about the developing diagnostic methods that can distinguish invasive from commensal species, and has

emphasized the re-estimation on the distribution of different species of world populations because of the impact on its treatment, particularly on low income populations that might develop invasive symptomatic amebiasis. The gene EhCBP-C13 from *Entamoeba* codes for a protein which has the ability to specifically bind to collagen that despite of being expressed in both species, expression on *E. dispar* is very low. High titers to this protein have been found in patients that present active hepatic amoebal infections. **Objective.** To evaluate a diagnostic method to detect invasive amoebal infections by *E. histolytica* through the use of EhCBP-C13 in ELISA type tests. **Methods.** The ELISA test performed with rEhCBP-C13 recombinant peptide was compared with staining direct observations (golden test). Kappa coefficient was used to evaluate diagnostic correlation. **Results.** An amebiasis frequency of 18.2% and 24.2% was found on parasitoscopic examinations and ELISA tests, respectively. An association between the percentage of positive samples to the presence of anti-C13 rEhCBP antibodies, and the presence of blood in stool ($p = 0.0003$) was found. Kappa correlation analysis demonstrated a relative concordance of $P_c=0.663$ and an absolute concordance of $P_o=0.939$. **Conclusion.** rEhCBP-C13 protein proved to be efficient for the serological diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection in people with amoebal dysentery.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, amebiasis diagnostic, collagen binding protein, amoebic colitis, Yucatan

Autor de correspondencia: Dra. Bertha Jiménez-Delgadillo. Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica Epidemiológica de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Itzáes 498 Centro, Mérida, Yucatán. México. Correo electrónico: jdelgad@uady.mx

Fecha de recepción: 24 de enero 2014. Fecha de aceptación: 2 de abril de 2014

INTRODUCCIÓN.

La amibiasis se define como la infección producida por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, la cual se caracteriza en su fase invasiva por la destrucción de células y tejidos de los órganos infectados. La infección por *E. histolytica* ocurre a nivel mundial, pero es más prevalente en el trópico. Esta parasitosis es adquirida por la ruta fecal-oral, a través del consumo de alimentos o agua contaminados con los quistes de las amibas, es decir, con la forma resistente del parásito. Esta parasitosis es considerada como la segunda causa de muerte debido a infecciones parasitarias (1) y afecta aproximadamente al 10%-12% de la población mundial. Sin embargo, la mayoría de las infecciones permanecen como asintomáticos y solo aproximadamente el 10% de la población infectada desarrollan las formas invasivas manifestándose principalmente como dos principales síndromes clínicos: la colitis amibiana y los abscesos amibianos (1), aunque el principal órgano colonizado e invadido por el

parásito es la mucosa intestinal del sigmoides y colon.

En las dos últimas décadas se planteó un panorama poco claro respecto a la biología del parásito, ya que se estima que de los aproximadamente 500 millones de seres humanos infectados en el mundo por *Entamoeba*, el parásito en la mayoría de las infecciones permanece como comensal en el intestino, produciendo quistes maduros que se excretan en las heces sin producir síntomas aparentes de enfermedad, es decir como comensales, y solamente el 10% de los infectados desarrollaban una enfermedad invasiva (2). Estos hechos condujeron a posturas controversiales de considerar la existencia de una o dos especies diferentes del parásito, uno comensal que potencialmente podía causar enfermedad, o la existencia de dos especies indistinguibles morfológicamente, una capaz de invadir los tejidos, y otra diferente no patógena que siempre permanecía como comensal.

Actualmente, se considera en base a pruebas bioquímicas y análisis de genes altamente conservados (3-7), la existencia de dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas: *E. dispar*, organismo no patógeno que no causa signos de enfermedad o invasión de la mucosa y *E. histolytica* agente causal de la colitis amibiana y todas las formas de amibiasis extraintestinal (5, 6, 8). Complicando el panorama epidemiológico, recientemente se ha considerado la presencia de otra amiba comensal *Entamoeba moshkovskii*, que también es indistinguible morfológicamente (9). El método diagnóstico más frecuentemente usado en el laboratorio de diagnóstico clínico rutinario, sobre todo en comunidades vulnerables con recursos económicos bajos y servicios limitados de salud, es la observación microscópica de quistes y/o trofozoitos (en casos de disentería). Sin embargo, las tres especies no pueden ser diferenciadas microscópicamente ya que morfológicamente son indistinguibles.

Ante este panorama se hace evidente el desconocimiento de la distribución mundial y la magnitud de la infección con estas tres especies de *Entamoeba*, ya que la mayoría de los diagnósticos se siguen basando en el microscopio que no permite diferenciarlas. El diagnóstico microscópico es poco preciso, y el consecuente retardo en el tratamiento son dos hechos muy comunes entre los 50 millones de pacientes que se estiman padecen de amibiasis invasiva cada año (10).

La Organización Mundial de la Salud ha establecido recomendaciones respecto al enfoque de investigación en amibiasis, con énfasis en la reestimación de la distribución de *E. histolytica* y *E. dispar* en la población mundial, debido a sus implicaciones tanto en el ámbito clínico como epidemiológico, para el correcto diagnóstico y tratamiento, sobre todo en poblaciones marginadas y vulnerables infectadas que pudieran desarrollar una amibiasis invasiva sintomática (11). Es de importancia contar con los nuevos procedimientos de diagnóstico, principalmente en países en desarrollo, los más afectados

debido a condiciones deficientes de higiene, contaminación fecal y hacinamiento, para reevaluar la morbi-mortalidad de la amibiasis (12,13).

El diagnóstico considerado como prueba de oro para la diferenciación de infecciones amibianas producidas por *E. histolytica* y *E. dispar*, es el aislamiento de trofozoitos de heces fecales y su diferenciación por análisis de zimodemos (demostración de perfiles electroforéticos de isoenzimas como evidencia indirecta de diferencias genéticas) (14). Avances en el diagnóstico para la diferenciación de ambas especies, han usado anticuerpos monoclonales epítipo-específico contra proteínas muy conservadas y altamente antigénicas como la lectina 170 kDa inhibible por galactosa, para su detección en heces y saliva demostrando ser un método cuantitativo para la diferenciación (15-17).

Otras proteínas han sido utilizadas como blancos para la diferenciación de especies de amibas. En *E. histolytica* se ha reportado la clonación de un gene de una proteína rica en cisteína de 29-30 kDa que se sugiere participa en mecanismos de patogénesis (18-20). Esta proteína posee propiedades antioxidantes y tiene una gran similitud a familias de peroxirredoxinas identificadas en varios organismos procariontes y eucariontes (21, 22). Aunque el gene también ha sido detectado en *E. dispar* (23), anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta proteína solamente reconocen la proteína expresada en trofozoitos de *E. histolytica* (24), además de ser altamente inmunogénica y específica para detectar amibiasis invasiva (25).

Recientemente, se aisló y clonó de un banco de cDNA de *E. histolytica*, un gene que codifica para una proteína de 30 kDa que se une a colágena tipo I denominada EhCBP-C13 (por sus siglas en inglés Collagen Binding Protein) (26). Péptidos recombinantes de EhCBP-C13 son capaces de unirse a geles de colágena nativa tipo I de una manera, pH, calcio, fuerza iónica y temperatura dependiente. La caracterización molecular de CBP-C13 mostró una gran similitud con la proteína de 29-30 kDa de la familia de

peroxirredoxinas previamente descrita y utilizada para diferenciar genéticamente a *E. dispar* a *E. histolytica*. La proteína recombinante rEhCBP-C13 es inmunogénica y protege parcialmente del absceso hepático amibiano en un modelo animal experimental (26).

En comunidades tropicales con condiciones de desarrollo humano bajo, los problemas de salud relacionados con la transmisión vía oral-fecal son frecuentes. Por ello, es importante contar con una prueba diagnóstica serológica que permita detectar y discriminar la presencia de una infección invasiva producida por *E. histolytica*, de otros tipos de agentes causantes de diarreas incluyendo la presencia de quistes y trofozoítos de *E. dispar* para evitar confusiones en el diagnóstico certero y tratamiento adecuado. Dado que la proteína EhCBP-C13, está relacionada con mecanismos de patogenicidad y es detectada por anticuerpos solamente en *E. histolytica* y no en *E. dispar*, el péptido recombinante rEhCBP-C13 se utilizó en un ensayo tipo ELISA para probar su utilidad en la detección de disentería causada por *E. histolytica*, en comunidades del Estado de Yucatán en donde la prueba diagnóstica para amibiasis se realiza únicamente mediante observación microscópica directa, y se contrastó con exámenes coproparasitológicos y observación directa con tinción especial (prueba estándar) para evaluar su correlación diagnóstica, analizando mediante la determinación del índice kappa.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio en el que se incluyeron individuos mayores de tres años, de ambos sexos. Se obtuvieron 35 sueros humanos de personas sanas que no presentaban sintomatología de amibiasis y sin antecedentes previos de diarreas y 33 pacientes que presentaban cuadro de diarrea aguda (4-5 evacuaciones semilíquidas de al menos 24 horas de evolución como mínimo, que acudieron a los servicios de urgencia y de consulta externa en el Centro de Salud Regional de Población Dispersa en la población de Sucopó Yucatán así como en el H.G. San Carlos en Tizimín, Yucatán, que

aceptaron participar en el estudio, previo consentimiento informado. Se obtuvieron heces y una muestra de sangre de los participantes y se les aplicó una encuesta para recabar datos epidemiológicos.

Obtención del péptido recombinante rCBP-C13.

Se realizó inducción del péptido recombinante utilizando un plásmido de expresión pGEX 2T con el fragmento de la clona C13 de *E. histolytica*, previa transformación de cepas de *Escherichia coli* DH5a (Difco), de acuerdo a lo descrito previamente (26). La proteína recombinante fue purificada por protocolos estándar (27).

Detección de anticuerpo específicos anti CBP-C13 de suero.

La detección de anticuerpos específicos anti rCBP-C13 se realizó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas tipo E.L.I.S.A. (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, NY, USA), a los que se adsorbieron 0.5 microgramos por mililitro del péptido recombinante rCBP-C13 toda la noche a 4°C en amortiguador de carbonatos pH 9.2. Se lavaron los pozos con TBS (Tris-HCl 50mM, NaCl 50 mM) /Tween al 0.1% y luego se bloquearon con TBS/albúmina bovina 1%. El suero de cada paciente se diluyeron a razón de 1:100 TBS/Tween 0.1%, se adicionaron a los pozos sensibilizados con el péptido recombinante y se incubaron 2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Para la detección se utilizó como segundo anticuerpo un conjugado de IgG humano, unido a la enzima peroxidasa y como sustrato y desarrollador de color OPD en amortiguador de citrato-fosfato. La reacción se detuvo con solución de ácido sulfúrico a 2.5 M. La lectura se realizó a una longitud de onda de 490 nm y las lecturas de la densidad óptica (DO) fueron corregidas del fondo inespecífico, restando la DO obtenida de pozos pareados sin el péptido recombinante, pero expuestos a un procedimiento idéntico. El punto de corte se estableció mediante 35 sueros humanos de personas sanas que no presentaban

sintomatología de amibiasis y sin antecedentes previos de diarreas, tomándose dos desviaciones estándar de la DO promedio obtenida.

Detección por observación directa.

Las muestras de heces fecales se procesaron para estudio de observación directa de las muestras de heces de los pacientes estudiados, de acuerdo a las especificaciones de la CDC de procedimientos de diagnóstico en heces (28), previa fijación con solución de Schaudinn modificada (29) y observación de frotis teñidos con la tinción tricrómica (30).

Análisis de concordancia diagnóstica.

Para el análisis de concordancia diagnóstica, la observación directa de muestras de heces teñidas y la sintomatología clínica concordante a colitis amibiana (como se realiza en la población de estudio en forma rutinaria), se consideró como prueba estándar, y la detección de anticuerpos anti proteína recombinante rEhCBP-C13 en un ensayo tipo ELISA como la prueba a estandarizar. La concordancia diagnóstica se calculó por medio de la prueba estadística del índice de kappa, la cual se encuentra basada en el modelo de la prueba estadística χ^2 diseñada para las variables no paramétricas (31).

RESULTADOS.

Estudiamos 33 pacientes, que se presentaron con diarrea aguda en Centros de Salud de comunidades rurales del Estado de Yucatán. Las diarreas estuvieron asociadas a dolor abdominal, distensión y disentería, tenesmo y flatulencias en la mayoría de los casos. De estos pacientes 16 fueron mujeres y 17 hombres en un rango de edad entre los 3 y los 70 años con una media de edades igual a 32.78 años, siendo la de mayor frecuencia los rangos de edad comprendidos entre los 11 a 20 años y de los 41 a 50 años.

El Cuadro 1 resume la comparación de las frecuencias de pruebas diagnósticas positivas a colitis amibiana en individuos con diarrea aguda, considerando como caso de colitis amibiana aquella muestra con visualización positiva de trofozoítos y/o quistes de *E. histolytica* en heces

fecales y/o presencia de anticuerpos séricos en los sujetos de estudio y que presente el cuadro clínico propio de diarrea amibiana. De los 33 pacientes analizados, el 18.2% (6) fueron positivos mediante la prueba diagnóstica de observación directa y el 24.2% (8) fueron positivos mediante la detección de anticuerpos séricos contra el péptido recombinante rEhCBP-C13.

Cuadro 1. Frecuencia de pruebas diagnósticas positivas a infección amibiana en individuos con diarrea aguda mediante observación directa y con anticuerpos séricos contra rEhCBP.

Prueba diagnóstica	Muestras analizadas (n=33)			
	Positiva	%	negativa	%
Observación directa	6	18.2	27	81.8
rCBP-C13-ELISA	8	24.2	25	75.8

En el Cuadro 2 se muestran las concordancias obtenidas al utilizar tanto la prueba por observación directa, como la detección de anticuerpos específico contra la proteína recombinante rEhCBP-C13. De los 33 pacientes analizados, todas las muestras positivas detectadas mediante observación directa fueron también positivas mediante la detección de anticuerpos anti rEhCBP-C13. El 18% (6) fueron positivos para ambas pruebas y el 6% (2) fueron positivos mediante la detección de anticuerpos contra la proteína recombinante, pero negativo a la observación directa. Estos resultados fueron analizados para obtener la correlación diagnóstica al comparar ambas pruebas obteniéndose una proporción de concordancia relativa o esperada (producida por el azar) de $P_c = 0.663$, una proporción de concordancia absoluta $P_o = 0.939$, y un índice kappa = 0.939. El valor de kappa obtenido se encuentra dentro de los valores aceptables descritos en la tabla de valores del índice de kappa, como concordancia casi perfecta. También se analizó la relación entre la condición clínica y la positividad de la prueba diagnóstica

con el péptido recombinante rCBP-C13 de *Entamoeba histolytica* en un ensayo tipo ELISA (Cuadro 3). Una de las principales condiciones clínicas relacionadas e indicativa de un proceso de invasión de la mucosa intestinal característica de una infección por *E. histolytica*, es la presencia de sangre en las heces fecales. Al comparar la frecuencia y porcentajes de pacientes con muestras negativas hacia la presencia de anticuerpos anti rEhCBP-C13, con la obtenida en pacientes con muestras positivas a la prueba, encontramos una asociación significativa ($p=0.0003$) de la positividad de la prueba con pacientes que tuvieron presencia de sangre en heces. Esta asociación no fue significativa con las demás condiciones clínicas analizadas (Cuadro 3).

Cuadro 2. Comparación de los resultados de concordancia entre las pruebas diagnósticas de observación directa y rEhCBP-C13-ELISA.

Prueba diagnóstica (n=33)		Núm.de muestra	
Observación directa	rEhCBP-C13 ELISA	s	%
+	+	6	18.18
+	-	0	0
-	+	2	6.06
-	-	25	75.75

(-) resultado positivo, (-) resultado negativo

Cuadro 3 Relación entre la condición clínica y la positividad de la prueba diagnóstica con el péptido recombinante rCBP-C13 de *Entamoeba histolytica* en un ensayo tipo ELISA.

Condición clínica	Análisis de muestras mediante rCBP-C13-ELISA (n= 33)				P
	Frecuencia de positivos		Frecuencia de negativos		
		(%)		(%)	
Diarrea líquida	3	37.5	7	28	0.94
Diarrea semilíquida	2	25.0	14	56	0.26
Diarrea Pastosa	3	37.5	4	16	0.42
Con Moco	5	62.5	18	72	0.94
Sin Moco	3	37.5	7	28	0.94
Con Sangre	7	87.5	3	12	0.0003
Sin Sangre	1	12.5	22	88	0.0003
Con Pujo	6	75	16	64	0.87
Sin Pujo	2	25	9	36	0.88
Con Tenesmo	4	50	11	44	0.911
Sin Tenesmo	4	50	14	56	0.911

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo encontramos una correlación diagnóstica muy alta entre la prueba diagnóstica para amibiasis por observación microscópica directa, con la prueba para la detección específica de anticuerpos contra la proteína recombinante rEhCBP-C13, que se une a colágena y que tiene similitud con proteínas de la familia de peroxirredoxinas con actividad antioxidante, características relacionadas con mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*. La amibiasis intestinal está ampliamente

distribuida en el trópico, sin embargo, la prevalencia y la incidencia de la enfermedad invasiva muestra una variación geográfica importante, probablemente porque la transmisión y las condiciones para que se produzca una infección invasiva está determinada en gran medida por las condiciones socioeconómicas y ecológicas de la población (32). En México se ha reportado una seroprevalencia (mediante hemaglutinación indirecta) en una muestra representativa de la República Mexicana, encontrándose un valor

total del 8.41% (33). Los valores más altos de seroprevalencia ($\geq 9\%$) se encontraron en el sureste del país incluyendo la península de Yucatán. El presente trabajo se realizó en la localidad de Sucopó que forma parte del municipio de Tizimín en el Estado de Yucatán, donde son muy frecuentes las infecciones intestinales por diversos agentes virales, bacterianos y parásitos y es necesario contar con pruebas diagnósticas, sencillas, de bajo costo y efectivas para lograr un buen diagnóstico diferencial y tratamientos certeros. En la muestra de la población estudiada, se encontró una frecuencia de positividad hacia usando la prueba diagnóstica por observación microscópica directa del 18.2%, en heces de pacientes con diarrea aguda y sintomatología clínica compatible con colitis amibiana. Usando la detección de anticuerpos específicos contra el péptido recombinante rEhCBP-C13 la detección aumento al 24.2%.

La correlación diagnóstica encontrada para el péptido recombinante de la proteína de unión a colágena (rEhCBP-C13) así como los resultados obtenidos de la positividad de la prueba con pacientes que tuvieron presencia de sangre en heces ($p=0.0003$), resultando ser una estrategia más sensible y efectiva que la prueba rutinaria de observación microscópica directa empleada en estas poblaciones.

REFERENCIAS.

1. Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003 Mar 22;361(9362):1025-1034
2. Walsh JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravdin JI, editor. *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. New York: Wiley, 1988:93-105.
3. Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978; 72(5): 519–21
4. Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991 Dec; 49(2): 297–302.
5. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 Jul; 86(13): 5118–22.
6. Tannich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J Clin Microbiol* 1991 Feb; 29(2):250-255.
7. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TFHG, Stanley SL Jr. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol* 1991 Apr; 29(4): 696–701.
8. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 (Emended Walker 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925; *J Eukaryot Microbiol.* 1993 May-Jun; 40(3):340–4
9. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri, WA Jr, Haque R, Clark CG. *Entamoeba moshkovskii* Infections in Children in Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003 May; 9(5):580-4
10. Abd-Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health.* 2002 Apr; 7(4):365–70
11. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico, 28-29 January 1997. *Epidemiol Bull* 1997; 18:13–4
12. Huston CD, Petri WA Jr. Amebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. *Curr Infect Dis Rep.* 1999 Dec;1(5): 441-7
13. Chacín-Bonilla L. Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. *Invest Clin.* 2010 Jun 51(2): 239 – 56
14. Ravdin JI. Intestinal disease caused by *Entamoeba histolytica*. In: *Amoebiasis: Ravdin J. Human Infection by Entamoeba histolytica*, 1st edn, Wiley and Sons, New

- York, 1988 pp. 495–509.
15. Abd-Alla M, Jackson T, Gathiram V, El-Hawey A, Ravdin JI. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection from nonpathogenic infection by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol.* 1993 Nov; 31(11):2845–50.
 16. Haque R, Nevil L, Hahn P, Petri W Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection using *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica* stool antigen kits. *J Clin Microbiol.* 1995 Oct; 33(10):2558–62.
 17. Jelinek T, Peyerl G, Loscher T, Nothdurft HD. Evaluation of an antigen-capture enzyme assay for detection of *Entamoeba histolytica*. stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Sep; 15(9):752–5.
 18. Bruchhaus, I, Tannich, E. Analysis of the genomic sequence encoding the 29kDa cysteine-rich protein of *Entamoeba histolytica*. *Trop Med Parasitol.* 1993 Jun; 44(2):116–8.
 19. Reed, SL, Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Stroehrer VL, Carlton JE, Diedrich DL, Torian BE. Molecular and cellular characterization of the 29-kiloDalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect Immun.* 1992 Feb; 60(2): 542–9.
 20. Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takeuchi T, Watanabe Y. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991 Oct; 29(10):2234–9.
 21. Bruchhaus I, Richter S, Tannich E. Removal of hydrogen peroxide by the 29kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* 1997 Sep; 15:326 (Pt 3):785–9.
 22. McGonigle S, Dalton JP, James ER. Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today.* 1998 Apr; 14(4):139–45.
 23. Tachibana H, Cheng XJ. *Entamoeba dispar*: cloning and characterization of peroxidoxin genes. *Exp Parasitol.* 2000 Jan; 94(1):51–5.
 24. Torian BE, Flores BM, Stroehrer VL, Hagen FS. cDNA sequence analysis of a 29kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1990 Aug; 87(16):6358–62.
 25. Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Petersen C, Diedrich DL, Torian BE. Structural analysis and demonstration of the 29kDa antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol-containing surface protein. *Mol Microbiol.* 1993Mar; 7(5):755–63.
 26. Jiménez-Delgado, Chaudhuri P, Baylón-Pacheco L, López-Monteón A, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL. *Entamoeba histolytica*: cDNAs cloned as 30kDa collagen-binding proteins (CBP) belong to an antioxidant molecule family. Protection of hamsters from amoebic liver abscess by immunization with recombinant CBP. *Exp Parasitol.* 2004 Sep-Oct; 108(1-2):7–17
 27. Smith DB, Johnson KS. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion peptides with glutathione-S-transferase. *Gene.* 1988 Jul; 67(1):31–40.
 28. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). DPDx Laboratory Identification of parasites of Public Health Concern. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Consultado el 10 de marzo de 2014 en: <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/staining.html>
 29. Horen WP. Modification of Schaudinn fixative. *J Clin Microbiol.* 1981 Jan; 13(1):204-5
 30. Ash LR, Orihel TC. Atlas de Parasitología Humana/ Atlas of Human Parasitology 5ta edición. Editorial Médica Panamericana, 2010; 556 p ISBN 978-950-06-0128-3
 31. Moreno Altamirano L, Cano Valle F, García Romero H. Epidemiología Clínica 2ª ed. Interamericana McGraw-Hill, 1994; p 80-86
 32. Raza A, Iqbal Z, Muhammad G, Ahmad M, Hanif K. Amoebiasis as a Major Risk to

Human Health: A Review. *Internat J Mol Med Sci.* 2013 Jun; 3(3):13-24

33. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. Sero-epidemiology of amebiasis in Mexico, *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Apr; 50(4):412–9