

Sobrediagnóstico de amebiasis en niños con disentería

Overdiagnosis of amebiasis in children with dysentery

Dr. Juan Carlos Beltramino^a, Bioq. Horacio Sosa^a, Dra. Natalia Gamba^a,
Bioq. Natalia Busquets^a, Dr. Lucas Navarro^a, Bioq. Stella Virgolini^a y
Téc. Omar Ricardo^a

RESUMEN

Introducción. Existen dos amebas, morfológicamente idénticas, cuyas diferencias determinan que una de ellas, *Entamoeba histolytica*, pueda ser patógena. La otra, *Entamoeba dispar*, es inocua. Surgió la presunción de que casos tratados como amebiasis, no lo fueran.

Objetivo. Identificar *E. histolytica* en niños con disenterías supuestamente amebianas.

Métodos. Estudio transversal y observacional realizado en Santa Fe, entre marzo de 2005 y noviembre de 2007. En niños de 2 meses a 15 años con disentería y exámenes directos con *E. histolytica/dispar*, se realizó ELISA para detectar la adhesina de *E. histolytica* (adhesina Eh) en heces. Se efectuaron coloraciones para amebas, coprocultivos y se registraron datos clínicos.

Resultados. De 75 casos estudiados, 35 fueron varones y 40 mujeres, con edad (mediana) de 3 años. Todos presentaron diarreas agudas con leucocitos; 73% en sangre visible microscópicamente y 27% en el estudio microscópico.

Tuvieron adhesina Eh positiva, 21. En 3 de ellos se detectaron trofozoítos hematófagos.

Se realizaron 15 coprocultivos, en 5 desarrolló *S. flexneri* de tipo S2. Otros parásitos: 6 (*Blastocystis homini* 5).

Tuvieron adhesina Eh negativa, 54. El 19% de las coloraciones demostró *E. dispar*.

A 44 se les realizaron coprocultivos; desarrollaron bacterias invasivas 12 casos: *S. flexneri* de tipo S2 (13), *Shigella sp* (1), *C. jejuni* (5), otros (3). Otros parásitos: 12 (*Blastocystis hominis* 9).

Conclusión. En este grupo de niños con "disenterías amebianas", en la mitad de los casos se identificaron bacterias invasivas y sólo en el 28% se detectó *E. histolytica* en heces, con lo cual cabría esperar una prevalencia de 18-38% de casos positivos en la población [IC 95% (0,179; 0,381)].

Palabras clave: amebiasis, diagnóstico diferencial, disentería bacilar.

SUMMARY

Introduction. There are morphologically identical amoebae, but with differences that can distinguish them; one as pathogenic: *Entamoeba histolytica*, and the other: *Entamoeba dispar*, as inoffensive. That brought the new hypothesis that many of the cases treated as amebiasis, weren't so. **Objective.** To identify *E. histolytica* in patients with dysentery, supposed to be caused by amoebae.

Methods. Transversal and observational study performed between March 2005 and November 2007 in the city of Santa Fe, Argentina.

Stools from children aged 2 months to 15 years-old with dysentery and direct exams with *E. histolytica/dispar*, were studied with ELISA to detect the adhesin of *E. histolytica* (adhesin Eh). Permanent stains for amoebae were done as well as stool cultures. Clinical data were charted.

Results. 75 children were studied; 35 were male and 40, female, with a median age of 3 years-old. All of them presented diarrhea with leucocyte, 73% macroscopic blood on stool and 27% detectable on the microscope.

Elisa Eh was positive in 21; 3 cases had hematophagous trophozoites.

In 15 stool cultures were found: *S. flexneri* S2 type in 5 cases. Other parasites: 6 (*Blastocystis homini* 5). In 54 adhesin Eh was negative, 19% of the colouring detected *E. dispar*.

From 44 stool cultures: *S. flexneri* S2 type was detected in 13, *Shigella sp* in 1, *C. jejuni* 5, other: 3. Other parasites: 12 (*Blastocystis homini* 9).

Conclusion. In this group of children with "amebic dysentery", half of them developed invasive bacteriae and only 28% had *E. histolytica* on stools; that means that the prevalence of positive cases in the population could be 18% to 38% [CI 95% (0,179; 0,381)].

Key words: amebiasis, differential diagnosis, bacillar dysentery.

a Hospital de Niños "Dr. Orlando Alassia". Santa Fe.

Conflicto de intereses:
Nada que declarar

Correspondencia:
Dr. Juan Carlos Beltramino:
jbeltramino@yahoo.com.ar

Recibido: 19-1-09
Aceptado: 04-8-09

INTRODUCCIÓN

En la región centro-norte de la provincia de Santa Fe es frecuente encontrar informes parasitológicos positivos para *Entamoeba histolytica* en niños con disentería.¹⁻⁴ Allí, pacientes con diarreas sanguinolentas reciben metronidazol (aun sin determinaciones de laboratorio), porque se presume que tienen alta posibilidad de padecer una enfermedad amebiana por la zona en la que habitan.

En otras regiones del país también se identificó a *E. histolytica* como el patógeno más frecuente en pacientes con diarreas mucosanguinolentas, muchas veces, asociado a *Shigella spp*.^{5,6}

Los diagnósticos de amebiasis in-

testinal se realizan, habitualmente, con los mismos criterios morfológicos vigentes hasta fines del siglo XX, a pesar de que han perdido validez desde que se comprobó que existen dos especies de amebas. Éstas resultan idénticas al microscopio, pero poseen diferencias bioquímicas, genéticas e inmunológicas que determinan que una, *E. histolytica*, pueda comportarse como patógena, y la otra, *Entamoeba dispar*, sea inofensiva.⁷⁻¹⁰

Estas amebas pueden diferenciarse mediante:

a) la observación, en un examen directo, de la capacidad que tienen los trofozoítos de *E. histolytica* para fagocitar hematíes; b) los cultivos con análisis de zimodemos; c) la detección de material genético por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹¹⁻¹⁵ y d) la pesquisa en muestras fecales de una enzima específica de *E. histolytica*, la galactosa-adhesina, mediante una prueba de inmunoanálisis (ELISA).

Se planteó la hipótesis de que, en nuestra región, era probable que muchos de los casos tratados como disenterías amebianas no lo fueran. Entonces, el objetivo fue precisar el diagnóstico de *E. histolytica* mediante la detección de adhesina en heces y determinar su frecuencia en niños con diagnóstico previo, por observación microscópica, de disenterías amebianas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional, descriptivo y transversal.

La población a estudiar estuvo constituida por pacientes de 2 meses a 15 años de edad, sin patologías graves asociadas, que consultaron en el Hospital de Niños "Dr. Orlando Alassia" de Santa Fe (Argentina), con diagnóstico de disentería y la presencia de *Entamoeba histolytica* en un examen parasitológico fecal directo, realizado en el laboratorio del Hospital o en laboratorios privados de la ciudad de Santa Fe.

Criterios de inclusión: niños mayores de 2 meses y menores de 15 años con diarrea con sangre macroscópica o microscópica e informe parasitológico directo positivo para *E. histolytica/dispar* y resultado del *E. histolytica test II*.

Criterios de exclusión: tratamientos previos con amebicidas, enfermedad grave asociada.

En fichas individuales se registraron los siguientes datos: edad, sexo, domicilio, fiebre, sangre en heces, leucocitos fecales, vómitos, dolor abdominal, parásitos asociados, enterobacterias y ELISA para adhesina de *E. histolytica* (*E. histolytica test II*).

Definición de términos: Disentería: diarrea con sangre macroscópica o en examen microscó-

pico (Modificado de: Disentería. Diálogo sobre la diarrea. N° 48 Oct-Dic 1994. AHRTAG, CID, OPS/OMS). Fiebre: temperatura axilar mayor de 37,2 °C. Diarrea aguda: menor de siete días de evolución. Enfermedad grave asociada: desnutrición grave, neumonía, sepsis, enfermedad intestinal inflamatoria, invaginación intestinal, fibrosis quística de páncreas, infección del sistema nervioso central, trastornos de la coagulación, inmunosupresión.

Los pacientes fueron captados por los investigadores, en el Servicio de Guardia, cuatro días por semana. De cada paciente se recogió una muestra de materia fecal, que se dividió en tres partes.

Una parte fue guardada a menos 20 °C para investigar la existencia de la enzima adhesina de *E. histolytica* (las adhesinas se degradan si la muestra se almacena a temperatura ambiente). Su presencia se demostró a través de un inmunoanálisis enzimático, "*Entamoeba histolytica II*", realizado de acuerdo al procedimiento indicado por el fabricante, (TechLab® Blacksburg, VA 24060 EE.UU.). Los resultados se interpretaron visualmente, en los casos positivos el desarrollo de color confirmó la presencia de los complejos enzima-antígeno-anticuerpo. Fueron comparados con pocillos de control, tanto positivos como negativos. Cuando en una reacción negativa, con el microscopio se vieron quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica/dispar*, se consideraron como *E. dispar*.

Otra parte de la materia fecal se colocó en solución acética formolada para realizar un nuevo examen parasitológico. Para visualizar amebas se realizaron exámenes con tionina o lugol y con coloraciones permanentes, hematoxilina-eosina o tricrómica de Wheatley. También se investigó la presencia de otros protozoarios y de helmintos.

La tercera parte de la muestra fecal se utilizó para coprocultivo. Se cultivó en agar-Mc-Conkey-sorbitol y en agar-*Salmonella-Shigella* incubados 18-24 h, a 37 °C. La identificación de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* se realizó mediante pruebas convencionales y la caracterización serológica con sueros polivalentes (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán"). Para *Campylobacter sp* se empleó medio de Skirrow modificado, en microaerofilia a 42 °C durante 24-48 h, para la generación de la atmósfera se empleó una mezcla de gases (nitrógeno 85%, dióxido de carbono 10% y oxígeno 5%) en jarras anaeróbicas. Se realizaron reacciones de catalasa, oxidasa, hidrólisis de hipurato y examen microscópico.

Análisis estadístico: se realizaron comparaciones de proporciones entre algunos grupos me-

diante la prueba de χ^2 o exacta de Fisher, según correspondiera. En todos los casos, se adoptó un nivel de significación $\alpha=0,05$. Los programas empleados fueron el SPSS 17.0 y Epi-info 6.0.

RESULTADOS

Entre marzo de 2005 y noviembre de 2007, del total de 1.210 pacientes que consultaron en la guardia del Hospital por disentería, 181 tuvieron diagnóstico presuntivo de disentería amebiana (Departamento de Estadística del Hospital), 89 de ellos fueron captados por los investigadores para recolectar una nueva muestra fecal. De estas, 14 fueron desechadas por dudas sobre la temperatura de almacenamiento del espécimen. La muestra estuvo constituida por 75 pacientes.

Del total de casos estudiados, 35 fueron varones y 40 mujeres, con un intervalo etario de 4 meses a 14 años y una edad promedio (mediana) de 3 años.

Todos presentaron diarreas agudas, el 72% con menos de 3 días de evolución. En 42 de 73 pacientes se constataron vómitos (en 2 no se registró la existencia del síntoma). En 57 de 62 hubo dolor abdominal y en 13 lactantes no se pudo precisar el síntoma. En 58 de 73 se constató fiebre (en 2 no se registró el síntoma). En 55 de 75 se observó, macroscópicamente, sangre en heces (73%) y en 20 se identificaron hematíes al examen microscópico (27%). En todas las muestras fecales hubo leucocitos.

En la comparación de los datos clínicos comunicados para los grupos adhesina *Eh* positiva y negativa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos síntomas (Tabla 1).

Resultados de la prueba de adhesina

De los 75 casos, sólo 28% tuvieron la prueba para *E. histolytica* positiva (adhesina *Eh* positiva), con lo cual cabría esperar una prevalencia entre

el 18% y el 38% de casos positivos en la población (IC 95%: 0,179-0,381).

Entre los casos adhesina *Eh* positiva se realizaron coloraciones permanentes a todos (n: 21) y en 10 (47,61%) se confirmó *E. histolytica*, 8 fueron trofozoítos y 2 quistes.

En tres niños se diagnosticaron trofozoítos hematófagos, 2 en el examen directo y 1 con coloración permanente. Sólo en uno se halló *E. histolytica* exclusivamente; en otro, se asoció con *Giardia lamblia* y en el restante, con *Shigella flexneri* de tipo S2.

Se realizaron coprocultivos en 15 casos (en 6, la muestra no fue enviada para cultivo). En 5, desarrolló *Shigella flexneri* de tipo S2; en 1, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y en 9, no se encontraron bacterias invasivas.

Se identificaron parásitos asociados en seis casos: *Blastocystis hominis* (5) y *Giardia lamblia* (1).

En los 54 casos del grupo adhesina *Eh* negativa se realizaron coloraciones permanentes a 48 de ellos; en 6 casos, las muestras no se conservaron en forma correcta para realizar las coloraciones.

Se identificó *Entamoeba histolytica/dispar* en 9 (19%) de los preparados (6 trofozoítos y 3 quistes).

Se encontraron parásitos asociados en 12 casos: *B. hominis* (9); *Ascaris lumbricoides* (1); *Hymenolepis nana* (1) y *Entamoeba hartmani* (1).

Se obtuvieron coprocultivos en 44 de los 54 casos mencionados (en 10 casos no fue conservada la muestra para efectuar cultivo bacteriano).

En los cultivos de 22 de los 44 niños estudiados hubo desarrollo de enterobacterias invasivas: *Shigella flexneri* de tipo S2 (13); *Shigella sp* (1); *Campylobacter jejuni* (5); *Salmonella thiphymurium* (1); *Salmonella sp* (1); y ECEP (1).

En un paciente se diagnosticó: "trofozoítos hematófagos" en el examen directo de materia fecal, pero no se encontraron amebas con las coloraciones, la adhesiva fue negativa y desarrolló *Shigella flexneri* de tipo S2 en el cultivo.

Del total de 75 pacientes con presuntas disenterías amebianas, en 79% se completaron coprocultivos y en 47,5% de ellos se identificaron bacterias invasivas, de las cuales, *Shigella spp.* fue la más frecuente (34%).

DISCUSIÓN

Hasta ahora, se ha considerado que la amebiasis intestinal invasiva es frecuente en la Región centro-norte de la Provincia de Santa Fe. Esta región incluye a los departamentos de los nodos de Salud: Rafaela, Reconquista y Santa Fe. Habitan alrededor de 1.300.000 personas, de las cuales 18% no poseen cañerías de agua potable en sus casas

TABLA 1. Síntomas en niños con disentería según la presencia de *Entamoeba histolytica* (n= 75)

| Síntomas | Adhesina + n 21 | | Adhesina - n 54 | | p |
|-----------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------|
| | sí | sin datos | sí | sin datos | |
| Vómitos | 11 | 0 | 31 | 2 | 0,5713 |
| Dolor abdominal | 17 | 2 | 40 | 11 | 0,6376 |
| Sangre macro | 17 | 0 | 38 | 0 | 0,3521 |
| Fiebre | 14 | 0 | 44 | 2 | 0,1123 |

y 19% no tienen retretes con descarga, según datos del IPEC (Instituto Provincial de Estadística y Censos) estimados al 30 de junio de 2007.

Estudios realizados en otros países demostraron que, en zonas con alta prevalencia de amebiasis, la mayoría de los individuos parasitados son portadores asintomáticos de *E. histolytica* y de *E. dispar*.¹⁶⁻²¹ La capacidad de *E. histolytica* para provocar disentería e infecciones extraintestinales es reconocida, pero en la mayoría de los casos las infecciones por este protozooario son asintomáticas.²²⁻²⁴

Para ejercer su patogenicidad, los trofozoítos de la ameba patógena se adhieren a las células del colon por medio de una proteína de superficie, la lectina de adhesión de galactosa llamada adhesina, para luego liberar enzimas que causan daño tisular. Petri y col. (1987) lograron, mediante anticuerpos monoclonales, aislar la lectina capaz de ser inhibida por la galactosa de *E. histolytica* y, de este modo, diferenciar la de *E. dispar*, incapaz de producirla.²⁵ Este tipo de prueba, al ser comparada con cultivos amebianos y con análisis de zimodemos, demostró una sensibilidad de 96,9% y una especificidad de 100%, con valor predictivo positivo de 100% y negativo del 96,8%.^{26,27}

La observación microscópica de la materia fecal es el examen más empleado para el diagnóstico de la amebiasis intestinal. Cuando en una muestra diluida con solución fisiológica se identifica un trofozoíto que forma pseudópodos con rapidez, se mueve en una dirección y tiene hematíes en su citoplasma, puede afirmarse que se trata de un ejemplar de *Entamoeba histolytica*, sin necesidad de recurrir a pruebas diagnósticas más onerosas.

Pero este examen directo tiene limitaciones en cuanto a la recolección de la materia fecal y la necesidad de contar con un observador avezado.

Si la muestra diarreica no se examina rápidamente los trofozoítos se desintegran. Para conservarlos deben emplearse fijadores y luego realizar coloraciones permanentes.

En este trabajo, únicamente en tres niños con adhesina-positiva pudo demostrarse la presencia de trofozoítos hematófagos de *E. histolytica*, en dos con el examen directo y en un tercero, con la coloración permanente; sólo en éste fue patógeno único.

Al considerar las coloraciones permanentes, pudo corroborarse la existencia de *Entamoeba histolytica/dispar* en casi la mitad de los casos adhesina-positiva, las que deben considerarse realmente como *E. histolytica*. Las amebas halladas en la quinta parte de los casos adhesina-negativa, al no producir la adhesina, pudo demostrarse que eran *E. dispar*.

Cuando se informó *E. histolytica/dispar* en el examen directo, el ELISA fue negativo y no se detectaron amebas con las coloraciones, caben dos posibilidades: el conservante no fue lo suficientemente eficaz o nunca fueron amebas. No sería arriesgado conjeturar que pudieran confundirse glóbulos blancos con trofozoítos pues se ha demostrado la posibilidad de sobrediagnóstico de amebiasis por confusión con leucocitos.²⁸ Al respecto, dice Fonte Galindo: "...pueden confundirse con mucha frecuencia trofozoítos amebianos con leucocitos, de manera particular con macrófagos que han fagocitado hematíes y quistes de unas amebas con otras, lo que conduce –en no pocas ocasiones– a resultados falsos positivos".²⁹

El comienzo agudo, la fiebre y presencia de leucocitos fecales son datos que hacen presumir una disentería por bacterias (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteroinvasiva).

En todos los niños estudiados, las muestras fecales observadas con el microscopio presentaron hematíes y leucocitos, y en casi la mitad de los coprocultivos realizados, desarrollaron bacterias invasivas (*Shigella flexneri*, la más frecuente).

Al comparar los dos grupos, según la presencia de la adhesina de *E. histolytica*, no se demostraron diferencias cuando se analizaron los síntomas clínicos. Este hecho, sumado a la presencia de leucocitos en heces, hace suponer que fueron las bacterias los agentes etiológicos más significativos en estos niños con disentería.

Que fueran encontrados, además, otros parásitos en la cuarta parte del total de pacientes investigados, puede ser considerado como un marcador de que la población estudiada estaba expuesta a condiciones de mal saneamiento ambiental.

Se señala, como una restricción, el no haber podido efectuar la investigación de *Escherichia coli* productora de shiga-toxina en niños con diarreas sanguinolentas. En el diseño del trabajo no se consideró la evaluación de tratamientos.

CONCLUSIÓN

En este grupo de niños santafesinos con diarreas (supuestas "disenterías amebianas"), se constató que sólo el 28% realmente tenía *E. histolytica* en heces, con lo cual cabría esperar una prevalencia de entre el 18% y el 38% de casos positivos en la población [IC 95% (0,179; 0,381)].

En alrededor de la mitad de los casos se identificaron bacterias invasivas y la más frecuente fue *Shigella flexneri* de tipo S2.

Puede decirse, que de cada diez pacientes con diagnóstico de "disentería amebiana", sólo tres

tuvieron *E. histolytica* en su materia fecal y que, de estos, sólo en uno fue patógeno único.

Se concluye que entre los pacientes que consultan por disentería en el Hospital de Niños de Santa Fe, más allá de la necesidad de precisar el diagnóstico de amebiasis, corresponde primero, sospechar causas bacterianas.

Agradecimientos

A la Licenciada Matemática Elena Carrera. Al Lic. en Comunicación Social Gustavo Martínez. A las Bioquímicas Liliana Gattino y Laura Municornoy. A la Fundación del Hospital de Niños de Santa Fe. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Beltramino M, Ruggieri JL, Villa BN. Prevalencia de enteroparasitosis en una población pediátrica de consultorios externos privados, de las ciudades de Reconquista y Avellaneda. *Rev Méd Santa Fe* 1989;22(2):52-6.
- Beltramino D, Lurá de Calafell MC, Turi de Morel J. Amebiasis intestinal "invasora" en pacientes pediátricos de la ciudad de Santa Fe. *Arch Argent Pediatr* 1991;89:202-8.
- Wagener M, Nóboli C, Drago S, et al. Prevalencia de enteroparasitosis en una población infantil del área programática del Hosp. de Niños de Santa Fe. (Resumen) 30º Congreso Argentino de Pediatría, Santa Fe 1994;296:167.
- Beltramino JC, Sosa H, Mayoral C, et al. Diarreas agudas en lactantes internados en Santa Fe. *Rev Hosp Niños Bs. Aires* 1998;40:234-239.
- Saredi N, Rowensztein G, Garello M, et al. Amebiasis en pacientes pediátricos, ¿una nueva epidemia? *Arch Argent Pediatr* 2001;99(5):462.
- Saredi N, Rowensztein G, Garello M, et al. Incidencia de enteroparasitosis en diarrea aguda. *Arch Argent Pediatr* 2001;99(5):462.
- Sargeant PG, Williams JE, Grene JE. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:519-21.
- Sargeant PG, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amebae of man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73:225-227.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40:340-344.
- WHO/PAHO/UNESCO: Expert Consultation on Amoebiasis. México, 28-29 January, 1997 (Summary) Weekly Epidemiological Record. WHO 4 april 1997.
- 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;29(2):250-255.
- Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:58-70.
- Furrows SJ, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Pathol* 2004;57:1264-1266.
- Roy S, Kabir M, Mondal D, et al. Real-time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2168-2172.
- Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, et al. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J Clin Microbiol* 2006;44:3196-3200.
- Pinheiro SM, Carneiro RM, Aca IS, et al. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(2):221-224.
- Tachibana WL, Kanbara H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(6):916-921.
- Kebede A, Verweij J, Dorigo-Zetsma W, et al. Overdiagnosis of amoebiasis in the absence of *Entamoeba histolytica* among patients presenting with diarrhoea in Wonji and Akaki, Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2003;97(3):305-307.
- Fonte L, Montalvo A, Alberti E, et al. Overdiagnosis of intestinal amoebiasis associated to serial microscopic examination of faeces. Some precisions on a problem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(6):799-800.
- Rayan HZ. Microscopic overdiagnosis of intestinal amoebiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 2005;35(3):941-51.
- Leiva B, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, et al. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006;37:529-534.
- Gathiram V, Jackson TFHG. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *South Afr Med J* 1987;72:669-672.
- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228-238.
- Petri W, Haque R, Lysterly D, et al. Estimating the impact of amoebiasis on health. *Parasitol Today* 2000;16(8):320-321.
- Petri WA, Smith RD, Schlesinger PH, et al. Isolation of the galactose binding lectin which mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 1987;80:1238-1244.
- Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, et al. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990;58:1802-1806.
- Haque R, Kress K, Wood S, et al. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence. *J Infect Dis* 1993;167:247-249.
- Núñez F, Finlay C. Adiestramiento en el diagnóstico de las parasitosis intestinales en la red de laboratorios de Cuba. *Cad Saúde Pública* 2001;17(3):719-724.
- Fonte Galindo L. Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. La Habana: Elfos Cientiae; 2000. Pág.120.