



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos

Isabel Fuentes Corripio*, María José Gutiérrez Cisneros y Teresa Gárate Ormaechea

Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
Coproantígenos
Diagnóstico
Parasitosis intestinales

Las parasitosis intestinales presentan una alta prevalencia en áreas tropicales y países en desarrollo, pero también son frecuentes en países industrializados. Tradicionalmente, su diagnóstico se ha realizado por el examen microscópico de las heces del paciente. Estas determinaciones muestran una sensibilidad pobre, exigen la toma de muestras seriadas, son muy laboriosas y requieren especialización técnica. En los últimos años, el avance en el estudio molecular de estos parásitos y la investigación de la respuesta inmune específica del paciente, junto con el empleo de las nuevas metodologías diagnósticas, han posibilitado el desarrollo de sistemas de detección más eficaces que apoyan al clínico, permiten el seguimiento de los tratamientos y facilitan los estudios epidemiológicos. Entre ellos, cabe destacar los métodos de detección de coproantígenos, que, en general, presentan buena especificidad y sensibilidad, y además se desarrollan en formatos sencillos, unas propiedades que los convierten en una herramienta útil en los laboratorios de microbiología.

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

Diagnostic of intestinal parasitosis by coproantigen detection

ABSTRACT

Keywords:
Faecal antigens
Diagnosis
Intestinal parasites

Intestinal parasites are highly prevalent in tropical areas and developing countries, but are also common in industrialised countries as well. Traditionally, their diagnosis has been made by microscopic examinations of the faeces of the patient. These have been shown to have poor sensitivity, require serial samples, are very time-consuming and require a specialised technique. In the last few years, advances in the molecular biology of these parasites and research into the specific immune response of the patient, has made it possible to develop more efficient detection systems that help the clinician, allow treatments to be followed up and make it easier to carry out epidemiological studies. Among these systems are the methods for detecting faecal antigens, which, in general, have good specificity and sensitivity; properties which make them a useful tool in microbiology laboratories.

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

Introducción

Los parásitos del tubo digestivo y órganos anejos, protozoos y helmintos, utilizan el intestino del hombre para su desarrollo y, con frecuencia, como medio de dispersión de productos o formas parasitarias de transmisión¹. Generalmente, son agentes infecciosos cosmopolitas, con mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales, que en muchas ocasiones se presentan asociados (poliparasitaciones), ocasionan graves problemas de salud en las poblaciones afectadas, especialmente niños e individuos inmunocomprometidos, y se

les considera marcadores de pobreza y estándares de higiene insuficientes². Actualmente, las enteroparasitosis mantienen una destacada presencia en países desarrollados en los que las parasitosis autóctonas se han visto incrementadas con las importadas de países tropicales, debido al aumento de viajeros a estas zonas y la gran afluencia de inmigrantes. En España no se conoce bien la prevalencia real de éstas, pues, aunque se han realizado estudios epidemiológicos puntuales en distintos grupos de población y áreas, no son enfermedades de declaración obligatoria, por lo que la infravaloración es importante. Así, se ha observado un marcado retroceso en la presencia de especies autóctonas, especialmente de helmintos, debido a la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias. No obstante, determinadas parasitosis, como las originadas por *Enterobius vermicularis* y *Giardia*, mantienen su prevalencia y otras, como las producidas por

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ifuentes@isciii.es (I. Fuentes Corripio).

Cryptosporidium, han aumentado, debido principalmente al carácter oportunista que presentan en pacientes inmunodeprimidos y a su mejor detección gracias a las nuevas técnicas diagnósticas.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las parasitosis intestinales se ha realizado por examen microscópico de heces del paciente, mediante el aislamiento y la identificación de las formas parasitarias que se eliminan³. Estas determinaciones, aunque en la mayoría de los casos son específicas, muestran una sensibilidad pobre, sólo permiten el diagnóstico de la infección aguda y patente, exigen la toma de muestras seriadas, son muy laboriosas y requieren especialización técnica. En los últimos años, el avance en el estudio molecular de estos parásitos y la investigación de la respuesta inmune específica del paciente, junto con el empleo de las nuevas metodologías diagnósticas, han posibilitado el desarrollo de sistemas de detección más eficaces que apoyan al clínico, permiten el seguimiento de los tratamientos y facilitan los estudios epidemiológicos necesarios para su control⁴. Entre ellos, cabe destacar los métodos de detección de coproantígenos⁵, que, en general, presentan unas buenas especificidad y sensibilidad. Además, se desarrollan en formatos sencillos, unas propiedades que los convierten en una herramienta útil en los laboratorios de microbiología. En el presente artículo se discutirán su fundamento, ventajas e inconvenientes, y las opciones que existen actualmente para la detección de helmintosis y protozoosis humanas intestinales.

Fundamento de los ensayos de detección de coproantígenos

Los coproantígenos son productos específicos de un parásito que se eliminan en las heces del paciente y que son susceptibles de su detección por técnicas inmunológicas⁶. La inmunodetección de coproantígenos se basa en el empleo de anticuerpos, monoclonales o policlonales, que reconocen específicamente los productos eliminados (secreción, superficie o somáticos^{6,7}) por los parásitos que invaden el intestino y órganos anejos del hombre⁸. Se han desarrollado métodos de coproantígenos para el diagnóstico tanto de protozoos como de helmintos, como describiremos a continuación^{8,9}.

De manera esquemática, en primer lugar, los anticuerpos preparados contra las moléculas del parásito a diagnosticar se inmovilizan sobre un soporte sólido, con frecuencia placas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)⁵, membranas inmunocromatográficas⁶ y otros materiales inertes. Después, los soportes sensibilizados se incuban con muestras diluidas de las heces sospechosas¹⁰. Por último, los complejos inmunes se detectan con el mismo anticuerpo empleado en un principio o con otro de especificidad semejante, o distinta, al previamente utilizado. La mayoría de los inmunoensayos comercializados utilizan el formato de enzimoimmunoensayo (ELISA-Ag), que presenta una alta sensibilidad y especificidad, pero requiere la adición de múltiples reactivos, numerosos pasos de lavados y tiempos de incubación, por lo que se están desarrollando métodos de inmunodiagnóstico no enzimáticos más rápidos, como las pruebas inmunocromatográficas. Estas pruebas se basan en la utilización de microesferas de materiales como el poliestireno, coloreadas, a las que se conjuga covalentemente un anticuerpo monoclonal anti-antígeno del parásito. El antígeno parasitario presente en la muestra de heces reacciona con las microesferas recubiertas de anticuerpos y forma un complejo (microesfera-Ag) que migra por un proceso cromatográfico por la zona de reacción. En esta zona se encuentra una franja con anticuerpos monoclonales contra el parásito que reaccionan con el complejo microesfera-Ag, lo que origina la formación de una línea de color que indica el resultado positivo. Las pruebas inmunocromatográficas son más rápidas y sencillas, no necesitan equipos de laboratorio especiales y se utilizan de forma individual. Frente a éstas, hay que destacar algunas ventajas del ELISA-Ag, como que permite procesar simultáneamente lotes de muestras y que, en la mayoría de los casos, presenta una sensibilidad y especificidad mayores que las pruebas de IC.

La detección de coproantígenos presenta las siguientes ventajas: a) la mayoría de las pruebas muestran una sensibilidad y especificidad excelentes; b) no requiere personal experimentado para su desarrollo; c) es un diagnóstico rápido, de fácil interpretación y que posibilita el cribado de gran número de muestras, de interés especial en casos de brotes; d) habitualmente, su desaparición de las heces se relaciona con la eliminación del parásito mediante una quimioterapia eficaz; e) conduce a la diferenciación entre infecciones pasadas y recientes, y f) permite, en algunos casos, la distinción de especies isomórficas del mismo género, como *Entamoeba histolytica* (patógena) de *Entamoeba dispar* (no patógena).

Hay que indicar que el diagnóstico por coproantígenos también presenta aspectos negativos, como el mayor coste de los reactivos, la obligación de emplear heces recientes o congeladas en la mayoría de los ensayos comercializados y, en ocasiones, la necesidad de examinar más de una muestra para conseguir un resultado concluyente. No obstante, aunque estas pruebas son más caras que los métodos microscópicos tradicionales, los costes de trabajo del personal son menores, sobre todo en las técnicas rápidas, por lo que el análisis de comparación de costes de las pruebas diagnósticas comentadas no es tan desfavorable, ya que en las pruebas microscópicas deben incluirse los reactivos, controles de calidad, tiempo de trabajo y requerimiento de personal cualificado en microscopia con el entrenamiento adecuado.

Diagnóstico de helmintos intestinales

Los grupos más importantes de helmintos parásitos del intestino, con las características morfológicas y las especies más relevantes, son: cestodos (planos y acintados, *Diphyllobotrium latum*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia saginata* asiática, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Dipylidium caninum*); trematodos (planos y foliáceos, *Fasciolopsis buski*, *Echinostoma ilocanum*, *Heterophyes heterophyes*, *Metagonimus yokogawai*, *Gastrodiscoides hominis*); nematodos (redondos y alargados, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Capillaria philippinensis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides fuelleborni*). También hay helmintos que parasitan órganos anejos al intestino, como los trematodos hepáticos (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Eurytrema pancreaticum*), trematodos sanguíneos (*Schistosoma*) y nematodos tisulares (*Trichinella*), que eliminan formas parasitarias y sus componentes con las heces del individuo infestado.

Todas las especies citadas son susceptibles del desarrollo de pruebas de coproantígenos para su diagnóstico, aunque hasta ahora sólo se han descrito pruebas para unas pocas¹¹, y son excepcionales los casos en los que el ensayo está comercializado⁷.

En los cestodos, concretamente en los ténidos, se ha puesto a punto un método de detección de coproantígenos que identifica productos de los adultos de *T. solium* y *T. saginata*⁸⁻¹² a través del uso de un suero policlonal de conejo preparado con antígenos somáticos de *T. solium*. Estos productos se encuentran en las heces de los portadores de ténidos, independientemente de la presencia concomitante de huevos y proglótidos –estado prepatente–, y desaparecen tras el tratamiento exitoso con un tenicida. De momento se desconoce la naturaleza de los antígenos reconocidos por el suero policlonal, aunque hay estudios que los relacionan con una molécula de 60 kDa, o componente antigénico mayoritario de *T. solium*^{11,12}. El ensayo detecta hasta 35 ng/ml del extracto del adulto y en su sensibilidad también influye el formato empleado¹¹ –ELISA o tiras de nitrocelulosa y PVDF¹¹– y la calidad del suero de conejo¹¹. Además, la prueba es específica del género *Taenia*, sin reacciones cruzadas con especies humanas de *Hymenolepis*, aunque no es capaz de distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Se emplea, principalmente, en estudios epidemiológicos sobre teniasis/cisticercosis^{8,13} y, de momento, no se ha comercializado. Es importante destacar que, muy recientemente, es-

Documento descargado de <http://www.elsevier.es> el 24/03/2010. Cópia para uso personal. Se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

tos mismos autores¹⁴ han publicado un ELISA de captura que combina el uso de anticuerpos IgG de conejo inmunizado con el antígeno completo de *T. solium* e IgG de conejo inmunizado con antígeno excreción-secreción (ES) del adulto, y que exhibe un 100% de especificidad en la detección de portadores con *T. solium*.

Para los trematodos, se han producido grandes avances en el caso de *F. hepatica* y *F. gigantica*^{5,15}. El grupo del profesor Ubeira, de la Universidad de Santiago de Compostela, ha desarrollado un anticuerpo monoclonal, MM3, con una especificidad muy interesante y preparado a partir de una mezcla de antígenos de ES del adulto del parásito, de 7 a 40 kDa y sin O-glucanos. Con esta herramienta se ha desarrollado un ELISA de captura, MM3-COPRO^{5,16}, que muestra un 100% de sensibilidad con heces de pacientes con fascioliasis y un 100% de especificidad con heces de pacientes con helmintiasis intestinales próximas. El ensayo supone la sensibilización de las placas con suero policlonal de conejo inmunizado con extracto completo de *Fasciola*, incubación con heces diluidas y detección de los complejos inmunes con MM3 biotinilado. Posteriormente, el complejo marcado con el anticuerpo monoclonal se pone de manifiesto con un antisuero con neutravidina y el sustrato orto-fenilendiamina (OPD). Además, el límite de detección de la prueba con heces humanas infectadas diluidas con CoproGuard⁵ es de 1,1 ng/ml, una concentración más baja que la descrita para otros ensayos¹⁵ y, por lo menos, tan sensible como el protocolo Kato-Katz. En estos momentos se trabaja para reducir el límite de detección y aproximarse a los que se consiguen en las fascioliasis ovina y vacuna, 0,3 y 0,6 ng/ml de heces diluidas, respectivamente¹⁶. Es importante destacar que el coproantígeno reconocido por MM3 desaparece de las heces tras un tratamiento fasciolicida eficaz. El sistema MM3 ya ha sido comercializado para su uso en la detección de la enfermedad en ovejas y vacas (MM3-COPRO)⁷. Investigadores cubanos han descrito otros sistemas de detección de antígenos de *Fasciola* en las heces¹⁵, que emplean un anticuerpo monoclonal, ES78, con especificidad por epítomos de *F. hepatica* y que, utilizando un sistema similar al descrito anteriormente, consiguen un límite de detección de unos 15 ng/ml de heces diluidas y una especificidad excelente. También, Abdel-Rahman et al (1998)¹⁷ han referido un ensayo de coproantígeno parecido para el diagnóstico de *F. hepatica* en el ganado vacuno, basado en el empleo del anticuerpo M2D5/DSF10. En cuanto a la opistorquiasis (*O. viverrini*), se han descrito diversos ELISA con anticuerpos monoclonales¹⁸⁻²¹, como el ensayo Mab-ELISA, que detecta un antígeno metabólico de 89 kDa de este trematodo hepático que produce patologías muy graves en áreas endémicas y que se detecta en las heces de los pacientes. Para terminar con los platelmintos, hay que indicar que se están realizando avances en equinostómidos^{22,23}, pero con modelos experimentales, y esperamos que, pronto, dichos avances sean trasladados a las correspondientes parasitosis humanas.

En relación con los nematodos, gusanos redondos, las pruebas de coprodiagnóstico no se encuentran tan desarrolladas como en los helmintos, que acabamos de revisar. Así, en la triquinelosis, Núñez et al (2007)²⁴ estudiaron la presencia de coproantígenos en las heces de pacientes implicados en brotes de la enfermedad utilizando un ELISA combinado con un anticuerpo monoclonal y sueros de pacientes con la enfermedad. Los autores no encontraron antígenos en las muestras estudiadas, a pesar de que el sistema presentaba un límite de detección de 49 ng/ml de extracto ES de *Trichinella*. En relación con los geohelmintos, se han descrito algunos intentos en ancilostómidos (*A. duodenale* y *N. americanus*) pero, de momento, sólo se han desarrollado para modelos experimentales, con la especie *Ancylostoma ceylanicum* y hámster²⁵.

Diagnóstico de las infecciones por protozoos intestinales

Los grupos de protozoos intestinales más relevantes son: amebas (*Entamoeba histolytica*), flagelados (*Giardia intestinalis*), coccidios (*Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Sarcocystis*),

microsporidios (*Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*), y *Blastocystis hominis*. Los avances realizados en el diagnóstico de estos protozoos son variables, aunque significativos en el caso de las especies que presentan una mayor importancia por su patología o alta prevalencia, como son *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica*, y en el mercado se encuentran diferentes pruebas diagnósticas basadas en la detección de antígenos de estos patógenos. La principal vía de transmisión de los protozoos en estudio es la fecal-oral directa, o a través de alimentos y aguas contaminadas, lo que ocasiona, sobre todo en el caso de *Giardia* y *Cryptosporidium*, frecuentes brotes comunitarios o masivos²⁶.

G. intestinalis (sinónimo *G. lamblia* o *G. duodenalis*) se encuentra en el intestino delgado originando la giardiosis, una de las parasitosis más comunes en los países industrializados. Ocasiona manifestaciones clínicas que varían desde pacientes asintomáticos a otros con enfermedad aguda o crónica, asociada a diarrea y malabsorción. Hasta el momento se han descrito 7 genotipos (denominados *assemblage* A-G) incluidos en esta especie, de los cuales sólo el A y el B afectan al hombre²⁷. Para sobrevivir en el hospedador, los trofozoitos presentan unas proteínas variables de superficie, antigénicamente diferentes, cuyo cambio de expresión induce a evadir la respuesta inmune del hospedador, lo que origina infecciones crónicas y recurrentes. Los trofozoitos colonizan el duodeno y el yeyuno, y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal por el disco ventral. El diagnóstico tradicional se basa en el reconocimiento de trofozoitos y quistes en las heces y, dado que la eliminación del parásito es intermitente, y a veces se elimina en un número escaso, se requiere el estudio seriado de, al menos, tres muestras para su diagnóstico. Así, diferentes estudios han mostrado que el análisis microscópico de una muestra sólo detecta, aproximadamente, el 70% de los casos, una cifra que es inferior al 61% en los pacientes asintomáticos²⁸; se necesita el análisis de tres muestras para alcanzar el 90%²⁹. En los últimos años se han desarrollado y comercializado diferentes técnicas de detección de coproantígenos. La inmunofluorescencia directa (IFD) utiliza un anticuerpo monoclonal para la detección de antígenos de la membrana parasitaria, como el GSA 65, con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 98%, aunque los valores de sensibilidad varían según los diferentes estudios y equipos comerciales^{30,31}. La ventaja de esta técnica es que puede utilizarse en las heces o en otro tipo de muestras biológicas y medioambientales, incluso arqueológicas, pues detecta las formas parasitarias completas^{32,33}. Las técnicas comerciales de ELISA-Ag de *Giardia* han supuesto una alternativa interesante al análisis microscópico seriado de las heces, ya que diferentes estudios clínicos de evaluación han mostrado que son unos métodos rápidos y con una buena relación coste-efectividad para el diagnóstico de dicha infección, por lo que puede evitarse el estudio seriado de las muestras en la mayoría de los casos sospechosos. Gran parte de estos métodos permiten procesar heces recientes o conservadas en formalina. Existen diversos sistemas ELISA comerciales que han sido evaluados en diferentes estudios y, aunque con variaciones, la sensibilidad y especificidad siempre han sido iguales o superiores al 90%^{28,31,34,35}. Las evaluaciones de diferentes inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales en la detección del antígeno GSA 65 o CWP1, o bien anticuerpos policlonales, mostraron una especificidad superior al 99% (99,3-100%), una sensibilidad que varía entre el 89 y el 100%, y unos valores predictivos positivo y negativo del 98-100% y 95-100%, respectivamente³⁴. También se han desarrollado, y están comercializados, inmunoensayos no enzimáticos, como los inmunocromatográficos, principalmente en formato tira o casete. Son sencillos y rápidos de realizar, y procesan muestras individuales, pero, en la mayoría de los casos, es necesario utilizar heces recientes (< 24 h), sin conservantes, o congeladas a -20 °C. Estas pruebas son muy útiles para un diagnóstico rápido, pero en los pocos estudios realizados hasta el momento han mostrado, generalmente, una menor sensibilidad que los ELISA-Ag (sensibilidad 58-97,2%, especificidad 99-100%)^{36,37}.

Cryptosporidium es uno de los parásitos oportunistas más comunes causantes de alteración gastrointestinal grave, principalmente en niños y pacientes inmunodeprimidos, tanto en enfermos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como en los trasplantados o en los pacientes sometidos a quimioterapia inmunosupresora³⁸. *C. hominis* y *C. parvum*, indistinguibles morfológicamente pero ambos patógenos, son las dos principales especies que parasitan al hombre y pueden dar lugar a casos esporádicos o a brotes²⁶. El diagnóstico tradicional se basa en el estudio microscópico tras tinciones especiales, como la de Kinyoun o de auramina-rodamina, pero los ooquistes son difíciles de identificar y pueden confundirse con artefactos; en muchas ocasiones, su escasa emisión por el paciente hace que presente una baja sensibilidad³⁹. Se han desarrollado y comercializado técnicas de inmunodiagnóstico, principalmente mediante IFD, diferentes métodos ELISA de detección de antígenos, así como técnicas inmunocromatográficas, que han mostrado una buena especificidad y sensibilidad, mayores del 94% y superiores a las de la observación microscópica³⁹. En un estudio se determinó que el límite de detección analítica mínima de la microscopia era de 50.000-500.000 ooquistes/g de heces, mientras que por IFD era de 5.000-10.000 ooquistes/g⁴⁰. Los métodos de coproantígenos comercializados hasta el momento detectan *Cryptosporidium*, sin diferenciar entre las especies *C. hominis* y *C. parvum*, ni otras especies del género⁴¹. Para la identificación de especies, un aspecto interesante en estudios epidemiológicos y de control, es obligado recurrir a técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁴². El diagnóstico de la criptosporidiosis por detección de coproantígenos presenta una sensibilidad y especificidad buenas; no obstante, se ha observado que la variabilidad antigénica entre diferentes cepas de *Cryptosporidium* puede determinar que algunas infecciones no se detecten⁴³. Igualmente, se ha observado variabilidad en la sensibilidad y especificidad de los diferentes sistemas comerciales de ELISA-Ag evaluados^{35,41,44}. Más aún, distintos estudios realizados que evalúan los mismos ensayos han mostrado una sensibilidad diferente, como se indicó anteriormente en el caso de *Giardia*. Los ensayos realizados por Ketanik et al en 2001⁴⁵ y Johnson et al en 2003⁴⁶, que utilizan ambos el ProSpect® *Cryptosporidium*, presentaron una sensibilidad del 70 y el 100%, respectivamente. En un estudio reciente de comparación de técnicas de microscopia, ELISA-Ag y PCR con un amplio número de enfermos, tanto seropositivos como seronegativos para el VIH, se observó una mayor positividad con el ELISA-Ag (18,9% en seropositivos, 13,7% en seronegativos), seguido de la PCR (13,1 y 11,1%, respectivamente) y, por último, la microscopia con Kinyoun (4,9 y 3,9%, respectivamente), lo que representaba un rendimiento de esta última del 32 y el 37,5% en pacientes seropositivos y seronegativos, respectivamente, respecto a las técnicas ELISA-Ag y PCR. Además, se apreció que las técnicas microscópicas fueron menos sensibles en aquellos pacientes seropositivos con recuento de CD₄ superior a 200 células/μl (la situación clínica más frecuente en estos momentos), debido a la baja eliminación de ooquistes, por lo que las técnicas de coproantígenos son de gran ayuda en estos casos³⁹. Están comercializadas pruebas inmunocromatográficas específicas para *Cryptosporidium* similares a las descritas para la detección de *Giardia*. Sin embargo, son las que combinan el diagnóstico de ambos parásitos simultáneamente las que resultan más interesantes en la actualidad, pues, aunque el coste es superior, suponen una buena herramienta, con sensibilidad y especificidad similares a las obtenidas para la detección individual^{35,47,48}. También están comercializadas técnicas de IFD que detectan los dos parásitos con buenos resultados diagnósticos^{44,49}.

E. histolytica es un importante patógeno que presenta prevalencias altas en áreas tropicales y países en desarrollo. No obstante, el fenómeno de la globalización y el aumento de viajeros e inmigrantes procedentes de estas zonas está ocasionando que aumente su presencia en los países industrializados³⁰. Origina un amplio espectro de presentaciones clínicas, desde la de portador asintomático hasta procesos entéricos, disentería amebiana o cuadros extraintestinales, como el absceso hepático. El diagnóstico se ha realizado, tradicional-

mente, por microscopia, pero este método presenta grandes limitaciones; la principal es la incapacidad de distinguir *E. histolytica* de las especies morfológicamente idénticas pero, hasta el momento, consideradas no patógenas: *E. dispar* y *E. moshkovskii*^{51,52}. La diferenciación de las especies requiere el cultivo y estudio de zimodemas, o las técnicas moleculares, como la PCR en tiempo real, más rápidas, sensibles y específicas⁵². Por otra parte, la sensibilidad de la microscopia es muy baja, aproximadamente del 60%^{52,53}, y requiere un grado de entrenamiento elevado del microscopista, dada la facilidad de confusión con otras especies similares de *Entamoeba*, o con artefactos como las células sanguíneas. El apoyo del diagnóstico serológico es de gran importancia, principalmente en los enfermos de zonas no endémicas, teniendo en cuenta siempre la persistencia de los anticuerpos tras la curación. Para la identificación específica se han desarrollado, como ya se ha indicado, las técnicas de PCR, pero la imposibilidad de introducir estos métodos en muchos laboratorios diagnósticos ha llevado al estudio de la detección de coproantígenos. En diferentes trabajos de investigación se han utilizado monoclonales frente a un antígeno de superficie rico en serina, un liposfoglucano y un antígeno de 170 kDa de la adhesina-lectina⁵². Se han comercializado técnicas de detección de coproantígenos amebianos, frecuentemente en formato ELISA-Ag, con buena sensibilidad, pero la mayoría detectan antígenos de *E. histolytica/dispar* y no permiten la diferenciación de ambas especies, lo que representa un gran problema para el diagnóstico, ya que la infección por *E. dispar* es de 3 a 10 veces más frecuente que la infección por *E. histolytica*⁵⁴. Hasta el momento, únicamente las técnicas comerciales ELISA TechLab *E. histolytica II*® y *Entamoeba* CELISA-PATH® son capaces de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, utilizando anticuerpos monoclonales frente a la lectina Gal/GalNAc específica de la primera. La lectina es un antígeno conservado y altamente inmunógeno, que presenta variaciones entre las dos especies de amebas y permite su diferenciación. La prueba debe realizarse sobre heces frescas recientes o congeladas, por la degradación de los antígenos. El principal inconveniente es la disparidad de resultados obtenidos en la evaluación de estos ensayos en los diversos estudios, que no permiten asegurar la especificidad y sensibilidad de la técnica para la detección de *E. histolytica*. Así, algunos mostraron una excelente correlación de TechLab *E. histolytica II*® comparado con una PCR a tiempo real, con una buena sensibilidad y especificidad (71 a 79% y 96 a 100%, respectivamente)⁵². Por el contrario, otros estudios han presentado una menor sensibilidad (14,3%) y especificidad (98,4%) comparado con el cultivo e identificación de zimodemas⁵⁵. También se ha descrito que algunas muestras positivas para *E. dispar* por PCR pueden ser positivas mediante ELISA. Stark et al⁵⁶, en un estudio reciente donde comparaban ELISA TechLab *E. histolytica II*® y *Entamoeba* CELISA-PATH®, con la PCR como técnica de referencia, encontraron que *Entamoeba* CELISA-PATH® mostró una sensibilidad del 28% y una especificidad del 100%, mientras que ELISA TechLab *E. histolytica II*® no detectó ningún positivo de *E. histolytica* con una especificidad del 99%; además, en el estudio cuantitativo de sensibilidad analítica, que llevaron a cabo con muestras preparadas a partir de cultivos xénicos, mostraron que CELISA-PATH® fue capaz de detectar una concentración de *E. histolytica* 10 veces menor (1.000 trofozoitos/pocillo) que ELISA TechLab (10.000 trofozoitos/pocillo), mientras que la PCR detectó un trofozoito. Por otra parte, los ELISA-Ag se han utilizado para la detección de antígenos del parásito en muestras de suero y abscesos hepáticos, aunque todavía están en fase de evaluación.

También se están comercializando técnicas inmunocromatográficas, hasta el momento desarrolladas para la identificación conjunta de *E. histolytica/dispar*. Aunque existen ensayos de detección individual, principalmente se están enfocando a aquellos que permiten la detección simultánea de antígenos del complejo *E. histolytica/dispar*, *G. intestinalis* y *Cryptosporidium*, que presentan buena especificidad y sensibilidad para los dos últimos parásitos pero variable en cuanto a la detección del complejo *E. histolytica/E. dispar*⁵⁷ (tabla 1).

Tabla 1
Documento descargado de <http://www.elsevier.es> el 24/03/2010. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.
Algunos ensayos comercializados para la detección de coproantígenos de *Giardia*, *Cryptosporidium* y *E. histolytica*

Parásito	Marca	Nombre comercial	Antígeno	Tipo de anticuerpo	Conservación	Formato	% sensibilidad (referencia)	% especificidad (referencia)
<i>Giardia</i>	Alexon	ProSpecT® <i>Giardia</i> Rapid	GSA 65 o CWP1	Monoclonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	90 (34)	100 (34)
<i>Giardia</i>	Alexon	ProSpecT® <i>Giardia</i> EZ Microplaca	GSA 65 o CWP1	Monoclonal	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	95,7 (34), 94 (44)	100 (34), 97 (44)
<i>Giardia</i>	Cellabs	CELISA® TechLab	GSA 65 o CWP1	Monoclonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	97 (44)	100 (34)
<i>Giardia</i>	Alexon	ProSpecT® <i>Giardia</i> Microplaca	SD	Policlonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	100 (34)	100 (34)
<i>Giardia</i>	Meridian	Premier	SD	Policlonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	92,9 (34), 98 (44), 100 (45)	100 (34), 97 (44), 98,4 (45)
<i>Giardia</i>	Trend	G. lamblia Direct Detection System	GSA 65 o CWP1	Policlonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	98,6 (34), 99 (44)	99,3 (34), 96 (44)
<i>Giardia</i>	Coris	Coris <i>Giardia</i> -Strip	Membrana quística	Monoclonal	Fresca/ congelada	IC	58 (37)	99 (37)
<i>Giardia</i>	Med. Chem. Corp.	Simple Read	SD	SD	Fresca/ congelada/ formalina	IC	97,2 (36)	100 (36)
<i>Giardia</i>	R-Biopharm	Rida Quick <i>Giardia</i>	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada	IC	80 (35)	98 (35)
<i>Cryptosporidium</i>	Alexon	ProSpecT® <i>Cryptosporidium</i> Microplaca	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	97 (44), 100 (45)	100 (44), 98,6 (45)
<i>Cryptosporidium</i>	Meridian	Premier <i>Cryptosporidium</i>	SD	Policlonales	Fresca/ congelada/ formalina	ELISA	91 (44)	99 (44)
<i>Cryptosporidium</i>	R-Biopharm	Rida Quick <i>Cryptosporidium</i>	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada	IC	88 (35)	98 (35)
<i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	Becton Dickinson	ColorPAC <i>Giardia/ Cryptosporidium</i>	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada	IC	<i>Cryptosporidium</i> 98,8 (47), 98,1 (45); <i>Giardia</i> 100 (47), 98,7 (45)	<i>Cryptosporidium</i> 98,8 (47), 99,5 (45); <i>Giardia</i> 100 (47), 98,7 (45)
<i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	Meridian	Merifluor <i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada/ formalina	IFD	<i>Cryptosporidium</i> 100 (44), 97 (31); <i>Giardia</i> 100 (44), 91 (31)	<i>Cryptosporidium</i> 100 (44, 31); <i>Giardia</i> 100 (44, 31)
<i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	R-Biopharm	Rida Quick Combi	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada	IC	<i>Cryptosporidium</i> 82 (35); <i>Giardia</i> 80 (35)	<i>Cryptosporidium</i> 98 (35); <i>Giardia</i> 80 (35)
<i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	Meridian	ImmunoCard STAT	SD	Monocloanes	Fresca/ congelada/ formalina	IC	<i>Cryptosporidium</i> 98,8 (48); <i>Giardia</i> 93,5 (48)	<i>Cryptosporidium</i> 100 (48); <i>Giardia</i> 100 (48)
<i>E. histolytica</i>	TechLab	TechLab <i>E.histolytica</i> II	Lectina Gal/ GalNac	Monoclonales	Fresca/ congelada	ELISA	96,9-100 (52), 14,2 (55), 0 (56)	94,7-100 (52), 98,3 (55), 99 (56)
<i>E. histolytica</i>	Cellabs	<i>Entamoeba</i> CELISA-PATH	Lectina Gal/ GalNac	Monoclonales	Fresca/ congelada	ELISA	95-100 (52), 28 (56)	93-100 (52), 100 (56)
<i>E. histolytica/dispar</i>	Remel	ProSpecT EIA	SD	Monoclonales	Fresca/ congelada	ELISA	54,5-87 (52)	94-99 para <i>E. histolytica/dispar</i> (52)
<i>E. histolytica/dispar</i>	Merlin Diagnostika	Optimum	Serina	Monoclonales	Fresca/ congelada	ELISA	100 (52)	SD (52)
<i>Cryptosporidium/ Giardia/E. histolytica/dispar</i>	Biosite	Triade parasite panel	SD	SD	Fresca/ congelada	IC	<i>Cryptosporidium</i> 98,3; <i>Giardia</i> 95,9; <i>E. histolytica/ dispar</i> 96 (57)	<i>Cryptosporidium</i> 99,7; <i>Giardia</i> 97,4; <i>E. histolytica/ dispar</i> 99,1 (57)

IC: inmunocromatografía; IFD: inmunofluorescencia directa; SD: sin datos.

Conclusión

Dado el interés en las pruebas de diagnóstico rápido, la dificultad de formar microscopistas buenos y bien preparados, la difícil introducción de técnicas de PCR en muchos laboratorios, la evidencia de que los parásitos intestinales pueden ocasionar síntomas graves en el hombre y que, en ocasiones, originan brotes de origen hídrico con afectación de un elevado número de personas, los laboratorios de

microbiología están revisando las opciones de los coproinmunoensayos que puedan incorporarse en los protocolos de diagnóstico habitual. Aunque los diversos laboratorios pueden tener un protocolo diferente de priorización y actuación, es recomendable realizar un primer análisis microscópico, pues para el diagnóstico de algunos parásitos es la única técnica disponible; además, se pueden detectar simultáneamente diferentes especies, y en caso negativo, según la situación clínica del paciente, en ocasiones puede ser conveniente

la realización de pruebas específicas de coproantígenos, dada la mayor sensibilidad y la buena especificidad de la mayoría de los ensayos comercializados. Si el resultado de la primera prueba es negativo y el paciente permanece sintomático, se debe realizar una nueva determinación. Es recomendable elegir las pruebas de detección de coproantígenos parasitarios que presenten una sensibilidad y especificidad buenas, que sean sencillas de realizar, con una relación adecuada de coste-beneficio y que faciliten un resultado rápido.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol.* 2009;163:196-206.
- Mupfasoni D, Karibushi B, Koukounari A, Ruberanziza E, Kaberuka T, Kramer MH et al. Poly-parasite helminth infections and their association to anaemia and undernutrition in Northern Rwanda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;15:e517.
- Portús M, Prats G. Contribution to the knowledge of intestinal protozoa infestation in the hospital population of Barcelona. *Med Clin (Barc).* 1981;76:203-5.
- Ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, Van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and qualification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:179-85.
- Ubeira FM, Muiño L, Valero A, Periago MV, Pérez-Crespo I, Mezo M et al. MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:156-62.
- Allan JC, Wilkins PP, Tsang VCW, Craig PS. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Trop.* 2003;87:87-93.
- Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M, Artigas P, Muiño L, Mezo M et al. MM-3 ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet Parasitol.* 2009;159:77-81.
- Allan JC, Craig PS. Coproantigen in taeniasis and echinococcosis. *Parasitol Int* 2006;55 Suppl:S75-80.
- Allan JC, Avila G, García Noval J, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology.* 1990;101:473-7.
- Maass M, Delgado E, Knobloch J. Detection of *Taenia solium* antigens in merthiolate-form preserved stool samples. *Trop Med Parasitol.* 1991;42:112-4.
- Flisser A, Gyorkos TW. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. *Parasite Immunol.* 2007;29:637-49.
- Maass M, Delgado E, Knobloch J. Isolation of an immunodiagnostic *Taenia solium* coproantigen. *Trop Med Parasitol.* 1992;43:201-2.
- Wandra T, Sutisna P, Dharmawan NS, Margono SS, Sudewi R, Suroso T et al. High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002-2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:346-53.
- Guezala MC, Rodríguez S, Zamora H, García HH, González AE, Tembo A et al. Development of a species-specific coproantigen ELISA for human *Taenia solium* taeniasis. *Am Trop Med Hyg.* 2009;81:433-7.
- Espino AM, Finlay CM. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. *J Clin Microbiol.* 1994;32:190-3.
- Mezo M, González-Warleta M, Carro C, Ubeira FM. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J Parasitol.* 2004;90:845-52.
- Abdel-Rahman SM, O'Reilly KL, Malone JB. Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am J Vet Res.* 1998;59:533-7.
- Sirisinha S, Chawengkirttikul R, Sermswan R, Amornpan S, Mongkolsuk S, Panyim S. Detection of *Opistorchis viverrini* by monoclonal antibody-based ELISA and DNA hybridization. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:140-5.
- Sirisinha S, Chawengkirttikul R, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Kaewkes S, Sithithaworn P. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Opistorchis viverrini* infection in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52:521-4.
- Chaicumpa W, Ruangkuaporn Y, Kalamaheti T, Limayongprance S, Kitikoon V, Khusmith S et al. Specific monoclonal antibodies to *Opistorchis viverrini*. *Int J Parasitol.* 1991;21:969-74.
- Chaicumpa W, Ybanez I, Kitikoon V, Pungpak S, Ruangkuaporn Y, Chongsang-nguan M et al. Detection of *Opistorchis viverrini* antigens in stools using specific monoclonal antibody. *Int J Parasitol.* 1992;22:527-31.
- Toledo R, Espert AM, Muñoz-Antoli C, Marcilla A, Fried B, Esteban JG. Development of an antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Echinostoma caproni* (Trematoda) in experimentally infected rats: kinetics of coproantigen excretion. *J Parasitol.* 2003;89:1227-31.
- Toledo R, Espert AM, Muñoz-Antoli C, Marcilla A, Fried B, Esteban JG. Kinetics of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antigens in feces and serum of experimentally infected hamsters and rats. *J Parasitol.* 2004;90:752-8.
- Núñez GG, Costantino SN, Venturiello SM. Detection of coproantibodies and fecal immune complexes in human trichinellosis. *Parasitology.* 2007;134:723-7.
- Bungiro RD, Cappello M. Detection of excretory /secretory coproantigens in experimental hookworm infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:915-20.
- Dorny Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol.* 2009;163:196-206.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus *Trends Parasitol.* 2009;25:93-100.
- Hanson KL, Cartwright CP. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:474-7.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:114-28.
- García LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens *J Clin Microbiol.* 1992;30:3255-7.
- Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, Calhoun LB, Yan SS. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. *J Clin Microbiol.* 2001;38:2781-3.
- Nishi L, Baesso ML, Santana RG, Fregadolli P, Falavigna DL, Falavigna-Guilherme AL. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. *Zoonoses Public Health.* 2009;56:221-8.
- Le Bailly M, Gonçalves ML, Harter-Lailheugue S, Prodeó F, Araujo A, Bouchet F. New finding of *Giardia intestinalis* (Eukaryote, Metamonad) in Old World archaeological site using immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:298-300.
- Aldeen WE, Carroll K, Robinson A, Morrison M, Hale D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1338-40.
- Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:656-9.
- García LS, García JP. Detection of *Giardia lamblia* antigens in human fecal specimens by a solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4587-8.
- Oster N, Gehrigh-Feistel H, Jung H, Kammer J, McLean JE, Lanzer M. Evaluation of the immunochromatographic CORIS Giardia-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:112-5.
- Stark D, Barratt JL, Van Hal S, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:634-50.
- Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Trop.* 2008;107:1-7.
- Weber R, Bryan RT, Bishop HS, Wahlquist SP, Sullivan JJ, Juranek DD. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods *J Clin Microbiol.* 1991;29:1323-7.
- Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54:274-9.
- Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, Casacui Carollo MC, Graczyk TK, Slemenda S, et al. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2835-40.
- Griffin K, Mattsahi E, Hommel M, Weitz JC, Baxby D, Hart CA. Antigenic diversity among oocysts of clinical isolates of *Cryptosporidium parvum*. *J Protozool Res.* 1992;2:97-101.
- García LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1526-9.
- Katanik MT, Schneider SK, Rosenblatt JE, Hall GS, Procop GW. Evaluation of Color-PAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4523-5.
- Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causler L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens *J Clin Microbiol.* 2003;41:623-6.
- García LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1267-8.
- García LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol.* 2003;41:209-12.
- Xiao L, Herd RP. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2944-6.
- Gutiérrez-Cisneros MA, Martín-Rabadán P, Menchén L, García-Lechuz JM, Fuentes I, Gárate T et al. Autochthonous amebic liver abscess in Spain: An emerging disease? Case report and description of a PCR-based diagnostic test. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27:326-30.

51. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925] Eukaryot Microbiol. 1993;40:340-4.
52. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007;20:511-32.
53. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 2003;16:713-29.
54. Anane S, Khaled S. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differentiation methods and implications. Ann Biol Clin (Paris). 2005;63:7-13.
55. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J et al. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2002;67: 123-7.
56. Stark D, Van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. J Clin Microbiol. 2008;46:1678-81.
57. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2000;38:3337-40.