

Especies del género *entamoeba* en fauna salvaje y doméstica: estudio epidemiológico y filogenético

Sara García Marín

Máster en Microbiología



MÁSTERES
DE LA UAM
2018 - 2019

Facultad de Ciencias



Universidad Autónoma
de Madrid

**ESPECIES DEL GÉNERO *ENTAMOEB*A EN FAUNA SALVAJE Y
DOMÉSTICA: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y FILOGENÉTICO**

Sara García Marín

Director: Francisco Ponce-Gordo

Tutor: Rafael Martínez-Díaz

**Lugar de realización: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de
Farmacia (UCM)**



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>ENTAMOEBA</i>	1
2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>ENTAMOEBA</i>	2
OBJETIVOS.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	5
1.1 <i>Recogida de las muestras</i>	5
1.2 <i>Limpieza de las muestras positivas</i>	5
1.3 <i>Extracción, amplificación y purificación del ADN</i>	6
1.4 <i>Secuenciación del ADN</i>	7
2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.....	7
2.1 <i>Identificación de las especies de Entamoeba</i>	7
2.2 <i>Análisis filogenético</i>	8
RESULTADOS	8
1. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS QUISTES DE <i>ENTAMOEBA</i> .	8
2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE <i>ENTAMOEBA</i> ..	12
<i>Especies de Entamoeba identificadas en galliformes</i>	12
<i>Especies de Entamoeba identificadas en struthioniformes</i>	12
<i>Especies identificadas en artiodáctilos</i>	12
3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	15
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

El género *Entamoeba* está formado por una gran variedad de especies comensales y patógenas, capaces de infectar a una gran variedad de vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces). Tradicionalmente la clasificación de estas especies se ha basado en las características morfológicas de los quistes, pero no es una herramienta fiable. Por ello, hoy en día se emplean las técnicas moleculares, como la secuenciación del gen codificante del ARNr 16s, no solo para la identificación y caracterización de las especies, sino también para establecer las relaciones evolutivas entre ellas. En la actualidad no existen muchos estudios sobre el rango de hospedadores de la mayoría de las especies de *Entamoeba*, por ello el objetivo de este trabajo fue estudiar la especificidad de hospedador y diversidad genética de las especies de *Entamoeba* pertenecientes a los grupos *coli* y *bovis*. Para ello un total de 47 muestras obtenidas de aves y mamíferos fueron analizadas microscópicamente y molecularmente. Los resultados mostraron que los diferentes grupos de animales son infectados por determinadas especies de *Entamoeba*. Siendo el grupo *bovis* común en animales ungulados y el grupo *coli* en primates y aves.

Palabras clave: aves, ARNr 16s, *Entamoeba*, grupo *bovis*, grupo *coli* y mamíferos.

ABSTRACT

The genus *Entamoeba* comprises a great variety of commensal and pathogenic species, that infect a great number of vertebrates (mammals, birds, reptiles, amphibians and fish). Traditionally the classification of these species has been based on the morphological characteristics of the cysts, but it is not an available tool. For this reason, molecular techniques, such as sequencing the gene of the rRNA 16s, are used not only for the identification and characterisation of species, also to establish the evolutionary relationships between them. Nowadays, there are not many studies of the host range of the majority of *Entamoeba* species, therefore the objective of this work was to study the host specificity and genetic diversity of *Entamoeba* sp. belonging to the group *coli* and *bovis*. A total of 47 samples obtained from birds and mammals were analyzed microscopically and molecularly. The results showed that the different species of animals are infected by certain species of *Entamoeba*. The *bovis* group is common in ungulate animals and the *coli* group in primates and birds.

Keywords: birds, rRNA 16s, *Entamoeba*, *bovis* group, *coli* group, and mammals.

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *ENTAMOEB*A

El género *Entamoeba* comprende una gran variedad de especies protistas descritas en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. La mayoría de las amebas descritas dentro de este género actúan como comensales dentro del propio intestino de los vertebrados (Martínez-Díaz et al., 2000; Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010). Sin embargo, algunas de estas especies son patógenas y han sabido adaptarse a una vida parasitaria en el tracto digestivo del propio hospedador causando graves enfermedades, como por ejemplo: *E. invadens* que infecta a reptiles (García et al., 2014), *E. nutalli* que infecta a primates no humanos o *E. moshkovskii*, *E. dispar* y *E. histolytica* que son capaces de infectar al ser humano y a otros mamíferos (Matsubayashi et al., 2014; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Al-Habsi et al., 2017). Incluso se han descrito especies de *Entamoeba* de vida libre en aguas residuales (Clark y Diamond, 1997; Tshalaia 1941) y sedimentos marinos (Shiratori y Ishida, 2016).

Las especies intestinales presentan dos estadios morfológicos en su ciclo de vida: quiste y trofozoito. Los trofozoitos no presentan una forma definida, por lo que los criterios de clasificación de los mismos se basan únicamente en el tamaño de las células. Los quistes en cambio presentan una forma y tamaño variable en función de la especie (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010).

La transmisión de estas especies intestinales ocurre por vía fecal-oral, es decir, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados por quistes maduros. Una vez que los quistes llegan al intestino delgado se produce la rotura de los mismos y la liberación de los trofozoitos. Desde el intestino delgado los trofozoitos migran hacia el intestino grueso y aquí se multiplican mediante sucesivas divisiones binarias, generando de nuevo los quistes que serán expulsados a través de las heces. Estos poseen una capa gruesa, lisa y uniforme, que les permite sobrevivir a las condiciones adversas del exterior y transmitirse a nuevos hospedadores (Cheng, 2012).

Excepcionalmente los trofozoitos intestinales de algunas especies son capaces de dañar los tejidos y penetrar las mucosas del colon, generando así disenterías y graves alteraciones gastro-intestinales (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016), e incluso pueden dañar otros órganos, como el hígado, los pulmones o el cerebro (Matsubayashi et al., 2014).

2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *ENTAMOEBEA*

La mayoría de los estudios realizados sobre *Entamoeba* se han basado en la detección de quistes y trofozoitos en muestras fecales e intestinales respectivamente. Hasta hace relativamente poco la identificación y clasificación de las especies de este género se han basado en las características morfológicas que presentan ambos estadios (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010; Stensvold et al., 2010; Regan et al., 2014; Al-Habsi et al., 2017). Sin embargo, estos criterios no son suficientes para delimitar las especies del género *Entamoeba*, ya que la morfología de los quistes no varía sustancialmente entre las diferentes especies y en algunos casos es difícil discernir entre dos especies morfológicamente idénticas (Clark et al., 2006; Levecke et al., 2010). Por ello, la introducción de técnicas moleculares, como la PCR o la secuenciación del gen codificante del ARNr 16s, son esenciales para solventar estos problemas (Stensvold et al., 2010; Matsubayashi et al., 2018), y así conocer las relaciones filogenéticas entre las distintas especies, pudiendo realizar estudios taxonómicos, filogenéticos y epidemiológicos más rigurosos que permitan una mayor comprensión de la evolución del género *Entamoeba* (Stensvold et al., 2011; Jacob et al., 2016).

Así pues, las especies de *Entamoeba* se han clasificado en cuatro grandes grupos en función de dos caracteres morfológicos que presentan los quistes maduros: su tamaño y el número de núcleos que presentan. Inicialmente se pensó que esta clasificación sí estaba apoyada por los resultados genéticos (Clark y Diamond, 1997) pero después se ha visto que no es así ya que el grupo *bovis* es polifilético (Ponce et al., 2007, Stensvold et al., 2010). El sistema se sigue manteniendo de manera informal para referirse a los distintos tipos morfológicos.

ESPECIES SIN QUISTES CONOCIDOS (GRUPO *GINGIVALIS*)

Las especies de este grupo únicamente presentan el estadio de trofozoito en su ciclo de vida. A este grupo pertenece la especie *E. gingivalis*, que fue la primera ameba parásita descrita en el hombre (Gros, 1849). Esta ameba se localiza en la cavidad bucal de humanos y animales domésticos (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010; Sard et al., 2011; Hooshyar et al., 2015), y a pesar de que se considera una especie comensal, frecuentemente está asociada a pacientes con enfermedades bucales como la periodontitis (Bonner et al., 2018).

En mamíferos también se han descrito otras especies como: *E. gedoelsti* (Hsiung, 1930) y *E. caprae* (Fantham, 1923), aisladas en caballos y cabras respectivamente. En reptiles (tortugas) se han descrito un par de especies; *E. barreti* (Taliaferro y Holmes, 1924) y *E. varini* (Lavier, 1928). Y por último en peces se han descrito dos especies: *E. pimelodi* (da Cunha y Penido, 1926) y *E. molae* (Noble y Noble, 1966).

En el caso de *E. gingivalis* está confirmado que no forma quistes. Sin embargo, la descripción del resto de especies citadas se ha basado en los trofozoítos que estos autores encontraban en las muestras, ya que nunca pudieron encontrar quistes. Por lo que cabe la duda de si estas especies verdaderamente no forman quistes, o simplemente no se han observado.

ESPECIES FORMADORAS DE QUISTES UNINUCLEADOS (GRUPO *BOVIS*)

Todas las especies descritas en este grupo son de localización exclusivamente intestinal, y hasta la fecha no se ha descrito ninguna especie patógena. El grupo *bovis* ha sido descrito en una gran variedad de hospedadores incluidos aves, mamíferos y peces (Bullock, 1966; Martínez-Díaz et al., 2000; Stensvold et al., 2010). Los ungulados suelen ser sus hospedadores más comunes (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010; Stensvold et al., 2010), sin embargo en aves (*Struthio camelus*) se ha descrito por primera vez una especie de este grupo, *E. struthionis* (Martínez-Díaz et al., 2000), la cual también ha sido aislada en cerdos y humanos. En cuanto a los reptiles y anfibios, no se conocen especies descritas de este grupo, pero sí existe una especie en peces, *E. gadi* (Bullock, 1966).

ESPECIES FORMADORAS DE QUISTES TETRANUCLEADOS (GRUPO *HISTOLYTICA*)

Las especies de este grupo también son de localización intestinal. Sin embargo, a diferencia del grupo *bovis*, algunas especies son patógenas, pudiendo dañar secundariamente otros órganos (cerebro, hígado o pulmón). El grupo *histolytica* fundamentalmente se ha descrito en primates (incluido el ser humano), donde las especies más habituales son: *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmanni*, *E. dispar* y *E. histolytica* (Ali et al., 2003; Verweij et al., 2003; Levecke et al., 2010; Royer et al., 2012). En aves únicamente se ha descrito la especie *E. anatis* en patos (Fantham, 1924), sin embargo no existen datos suficientes que lo avalen. En cuanto a especies descritas en reptiles y anfibios existen pocos datos, pero destaca *E. ranarum* aislada en

ranas (Grassi, 1879), y varias especies de *Entamoeba* descritas en lagartos, serpientes y tortugas. Por último, en peces se han descrito dos especies; *E. ctenopharyngodoni* (Chen, 1956) y *E. nezumia* (Orias y Noble, 1971), aisladas de peces de agua dulce y salada respectivamente.

Además como ya se ha mencionado anteriormente, existen algunas amebas de vida libre que se han aislado en aguas residuales y sedimentos marinos, y que pertenecerían al grupo *histolytica*: *E. ecuadoriensis*, *E. moshkovskii* y *E. marina* (Clark y Diamond, 1997; Fonseca et al., 2016; Shiratori y Ishida, 2016).

ESPECIES FORMADORAS DE QUISTES OCTONUCLEADOS (GRUPO *COLI*)

Todas las especies descritas de este grupo se consideran comensales y se localizan en el ciego y en el colon de una amplia gama de hospedadores, incluidos aves, mamíferos, reptiles y peces (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010). En mamíferos se han descrito una gran variedad de especies formadoras de quistes octonucleados tanto en animales silvestres como en animales domésticos. En roedores se han descrito numerosas especies como por ejemplo: *E. muris* (Grassi, 1879), *E. cobayae* (Holmes, 1923), *E. caviae* (Chatton, 1918) o *E. citelli* (Becker, 1926). Sin embargo muchas de ellas pueden ser sinónimas, ya que la propuesta de especies se ha basado en la especie de hospedador. En primates se ha identificado solo una especie: *E. coli* (Levecke et al 2010); y en otro tipo de hospedadores como las cabras *E. wenyoni* (Galli-Valerio, 1935). En aves únicamente se ha descrito la especie *E. gallinarum* en gallinas, pavos, patos, pintadas y gansos (Martínez-Díaz et al., 2000). Hasta el momento, en anfibios no se conocen especies de *Entamoeba* con quistes de ocho núcleos, pero en reptiles se han descrito varias especies como *E. lacerticoli* (Wood, 1935). Por último en peces se ha descrito *E. salpae* (Alexeieff, 1912), sin embargo la clasificación de esta especie no está del todo clara.

OBJETIVOS

En la actualidad no existen suficientes datos sobre el rango de hospedadores de la mayoría de las especies del género *Entamoeba*. Además la mayoría de los estudios epidemiológicos y filogenéticos publicados hasta el momento se han centrado en los grupos *coli* e *histolytica*, y principalmente en aquellas especies patógenas que afectan al ser humano. Es por ello que el objetivo del presente trabajo es identificar las especies

del género *Entamoeba* y sus hospedadores, así como conocer las relaciones filogenéticas entre dichas especies, basándose en las secuencias obtenidas a partir del gen codificante del ARNr 16s.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1.1 Recogida de las muestras

Las muestras fecales fueron recolectadas por el personal de Faunia y Zoo-Aquarium Madrid unas horas antes de su posterior análisis, e inmediatamente se trasladaron al laboratorio para evitar, en la medida de lo posible, la degeneración de las formas parasitarias.

Una vez en el laboratorio, se procedió a su concentración según el método de Bailenger (1963) y a partir de dicho concentrado se analizaron microscópicamente para seleccionar aquellas que presentaban quistes de *Entamoeba*. Para ello, se realizó un montaje húmedo con una pequeña muestra del sedimento obtenido teñido con lugol, para facilitar la observación de los quistes y de los núcleos.

1.2 Limpieza de las muestras positivas

Las muestras positivas se limpiaron mediante un gradiente de sacarosa para aislar los quistes y eliminar, en la medida de lo posible, las impurezas (restos minerales, bacterias, etc.) que pudieran existir e interferir en la posterior extracción del ADN.

En primer lugar, se eliminaron los elementos más pesados (restos minerales) mediante decantación espontánea. Para ello, parte del sedimento obtenido en la concentración se transfirió a un épendorf de 1,5 ml y se resuspendió con agua destilada; tras unos segundos, el sobrenadante fue transferido a un nuevo épendorf. Este proceso se repitió 3 veces. Tras la última decantación, se hicieron dos lavados mediante resuspensión del pellet en agua destilada y centrifugación a 4000 rpm durante 15 min. El pellet finalmente obtenido fue resuspendido y transferido con cuidado a un tubo de 4 ml en el que se había colocado previamente 2 ml de sacarosa al 39%, evitando la mezcla de líquidos. Los tubos fueron centrifugados a 500 rpm durante 15 min. En estas condiciones, los quistes atravesaban la interfase sacarosa-agua, pero las bacterias y los restos de pequeño tamaño quedaban retenidos en dicha interfase. La fase acuosa y la interfase se retiraron tras la centrifugación; se añadió a continuación agua destilada a la

fase de sacarosa y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, dos veces, con el objetivo de eliminar (por dilución) la sacarosa. El sedimento obtenido se transfirió a un épendorf, en donde se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min para obtener un sedimento y poder ajustar el volumen total a unos 200 μ L. Finalmente, dicho sedimento se analizó microscópicamente, procediendo de la misma forma que en el apartado 1.1, para comprobar la presencia de quistes.

1.3 Extracción, amplificación y purificación del ADN

La extracción de ADN de los quistes procedentes de las muestras positivas se realizó siguiendo el protocolo de extracción fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2006). El ADN extraído se amplificó empleando el kit illustra™ PuReTaq Ready-To-Go™ (GE Healthcare, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ L, que contenía 1.5 μ L de cada uno de los cebadores (Tabla 1), 7 μ L de muestra y 15 μ L de agua MilliQ.

Inicialmente, en cada muestra se amplificó una parte del gen que codifica el ARNr 16s; el fragmento, de aproximadamente 800 pb en el extremo 3', incluye las regiones III y IV del gen, en donde se localizan las regiones hipervariables (segmentos de expansión) ES8 a ES12. Para estas amplificaciones se emplearon los cebadores EG12D-EF2 (Tabla 1). El programa de PCR empleado fue el siguiente:

- Activación a 94°C, 5 min.
- 30 ciclos de:
 - o Desnaturalización (94°C, 1 min.)
 - o Anillamiento de cebadores (60°C, 1 min.)
 - o Elongación (72°C, 1 min.)
- Elongación final (72°C, 5 min.)
- Parada de la reacción (4°C, por tiempo indefinido)

En aquellos casos en que la secuencia parcial obtenida del gen no coincidía con ninguna de las depositadas en la base de datos del GenBank, se realizó la amplificación completa del gen empleando los cebadores E1-EF2 (Tabla 1). El programa de PCR fue como el indicado anteriormente, con la diferencia de que la fase de elongación se alargó a 3 min.

La presencia de productos de PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y posterior visualización con un transiluminador de UV. Posteriormente el ADN amplificado se purificó empleando para ello el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

ORGANISMO	CEBADOR	SECUENCIA	SENTIDO	T _m °C
<i>Entamoeba</i>	EFIN2 (EF2)	TGATCCTTCCGCAGGTTACAC	Reverso	65,4
<i>Entamoeba</i>	EGEN12D (EG12D)	CACGGGAAACTTACCAAGACC	Directo	67,4
<i>Entamoeba</i>	E1	GTTGATCCTGCCAGTATTATATG	Directo	58,9

Tabla 1. Cebadores empleados en la PCR

1.4 Secuenciación del ADN

Los productos purificados fueron secuenciados mediante el Método de Sanger por el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Al Servicio de Secuenciación se le proporcionó 6 µL del producto de PCR por reacción, y los cebadores con los que se realizó la amplificación. En el caso de la secuenciación del gen completo, la parte interna se secuenció mediante *primer walking*.

2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

2.1 Identificación de las especies de *Entamoeba*

En primer lugar, los cromatogramas de las secuencias parciales obtenidos se editaron manualmente utilizando el programa *ChromasPro* versión 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd., Queensland, Australia) para corregir las posibles ambigüedades y eliminar las regiones con ruido y la adenina terminal que incorpora la Taq polimerasa. Una vez procesadas las secuencias, se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Mediante *BLASTn* (Basic Local Alignment Search Tool, disponible a través de la web del National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se alinearon las secuencias de referencia con las del presente trabajo, señalando las posibles discrepancias existentes en algunas posiciones.

En aquellos casos en los que la secuencia obtenida no se correspondía con ninguna de las disponibles en GenBank, ni había sido previamente amplificada en su totalidad, se procedió a la amplificación del gen codificante del ARNr 16s completo. Las

secuencias completas obtenidas del gen se usaron para el posterior alineamiento múltiple y análisis filogenético.

2.2 Análisis filogenético

Las secuencias completas obtenidas junto con las depositadas en el GenBank se alinearon con el programa informático 4SALE (Synchronous RNA Sequence and Secondary Structure Alignment and Editing, versión 1.7 (Seibel et al., 2008), teniendo en cuenta la estructura secundaria del gen codificante del ARNr 16s. Para ello, se utilizó como modelo la estructura secundaria propuesta por Alfonso et al. (2012) para el del gen codificante del ARNr 16s de *E. histolytica*, que fue transferida al resto de secuencias de *Entamoeba* mediante modelado homólogo con la opción “model” disponible en la ITS2 Ribosomal RNA Database (disponible en: <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>). En las regiones en las que la transferencia automática de la estructura generaba hélices parciales o incompletas, se determinó *de novo* su estructura secundaria mediante el servidor RNAfold Web Server (disponible en: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). La edición de las estructuras secundarias transferidas, en caso de ser necesario realizar correcciones, y el alineamiento definitivo, se realizó en 4SALE.

A partir de las secuencias alineadas, utilizando el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) se realizó su análisis filogenético por los métodos de Máxima Similitud (*maximum likelihood*, ML) y Máxima Parsimonia (MP). El análisis de ML utilizó el modelo general de sustitución de nucleótidos reversible en el tiempo con distribución gamma (*general time reversible*, GTR, +G), que fue el mejor modelo seleccionado de acuerdo con el criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC) y el de información bayesiana (*Bayesian Information Criterion*, BIC) disponibles en MEGAX. En ambos métodos (ML y MP), el soporte estadístico se basó en 1000 réplicas (*bootstrap*).

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS QUISTES DE *ENTAMOEBAS*

Se recolectaron un total de 47 muestras fecales de 36 especies de hospedadores distintos, incluidos aves y mamíferos. El análisis microscópico reveló la presencia de quistes de *Entamoeba* en el 92% de las muestras. Los quistes presentaban una forma

esférica, rodeados de una pared gruesa, lisa y uniforme; y con un tamaño variable en función de la especie.

Las muestras de aves fueron recolectadas de dos órdenes: galliformes (gallina y pintada) y struthioniformes (ñandú). En una de las muestras de ñandú aparecieron quistes uninucleados de un tamaño aproximado de 15-20 μm , compatibles con *E. struthionis* (Fig. 1); la otra muestra de ñandú presentaba quistes tetranucleados de un tamaño entre 18-25 μm , compatibles con *E. anatis* y en el resto de muestras procedentes de gallina y pintada, quistes octonucleados con un tamaño de 20-25 μm y una morfología compatible con *E. gallinarum*. Sin embargo, también eran morfológicamente compatibles con los quistes de otras especies del grupo *bovis*, *histolytica* y *coli* respectivamente. Por ello, los organismos se identificaron como *Entamoeba* 'tipo *polecki*', *Entamoeba* 'tipo *anatis*' y *Entamoeba* 'tipo *coli*', hasta obtener los resultados moleculares que pudieran determinar la especie.

Las muestras de mamíferos procedían de dos grupos distintos: primates y ungulados. La gran mayoría de las muestras de ungulados pertenecían a animales de dos órdenes distintos: perisodáctilos (caballos, cebras, tapir malayo y rinoceronte) y artiodáctilos (cerdos, jabalís, jirafa, ciervo, corzo, etc.). Todas las muestras de primates (salvo la de colobo), presentaban una gran cantidad de quistes octonucleados con un tamaño que oscilaba mayoritariamente entre 18-25 μm y una morfología compatible con *E. coli*, por lo que se han identificado como *Entamoeba* 'tipo *coli*' (Fig. 2). En cambio, en colobos se hallaron quistes tetranucleados similares a *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moskhovskii*, y también a *E. nuttalli*, por lo que fue identificada como *Entamoeba* 'tipo *histolytica*' a falta de resultados moleculares.

En las muestras procedentes de perisodáctilos (rinocerontes, tapir malayo, caballo y cebra), no se encontraron quistes de *Entamoeba*. Sin embargo, sí se hallaron otros protistas, como ciliados y nematodos, en las muestras de cebra. La morfología de los quistes uninucleados de *Entamoeba* presentes en las muestras de artiodáctilos rumiantes era similar a *E. bovis*, sin embargo entre las diferentes muestras se observaron diferencias en el tamaño (con quistes de tamaño entre 4-8 μm o entre 7-12 μm), por lo que no se asignó una especie definitiva (*Entamoeba* 'tipo *bovis*') (Fig. 3). Por otro lado, los artiodáctilos no rumiantes (cerdos, jabalí y babirusa) presentaban quistes uninucleados de entre 15-20 μm , que se asemejaban a los de *E. polecki*, pero también podría tratarse de otras especies uninucleadas (*E. chattoni*/*E. struthionis*), por lo que a este organismo se le denominó *Entamoeba* 'tipo *polecki*'.

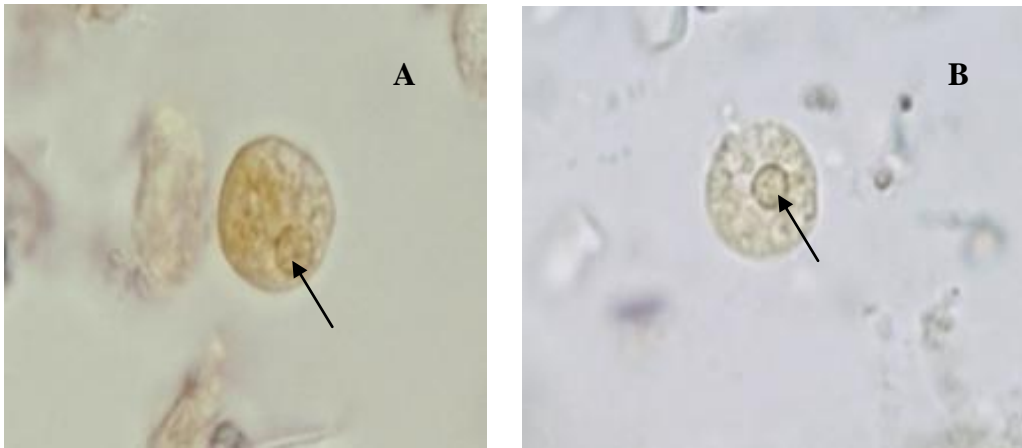


Figura 1. Imágenes obtenidas por microscopía óptica a 100x. Quistes uninucleados de *Entamoeba* aislados de Ñandú (*Rhea americana*). Las flechas negras señalan la posición del núcleo.

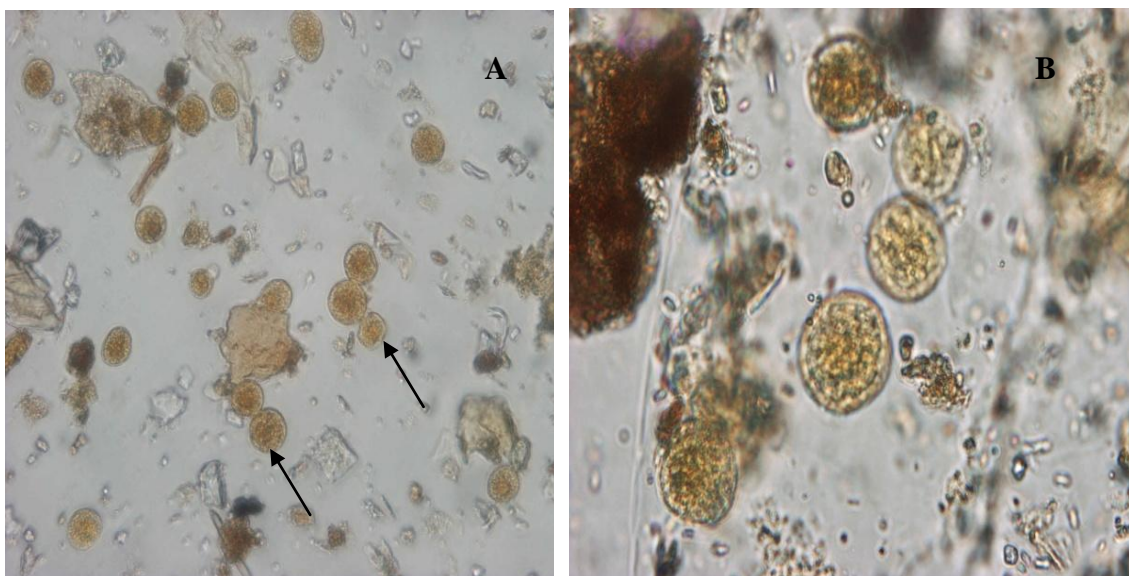


Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía óptica. A) Las flechas negras señalan los quistes octonucleados de *Entamoeba* aislados de chimpancé. Imagen obtenida a 40x
 B) Quistes octonucleados de *Entamoeba* aislados de chimpancé. Imagen obtenida a 100x.

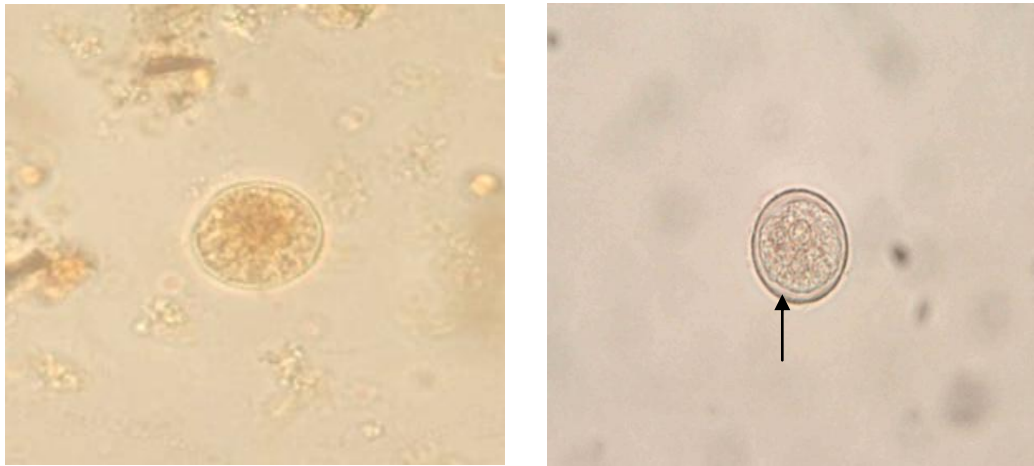


Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía óptica a 100x. Quistes octonucleados de *Entamoeba* aislados en mandril. La flecha negra señala la cubierta o pared del quiste.

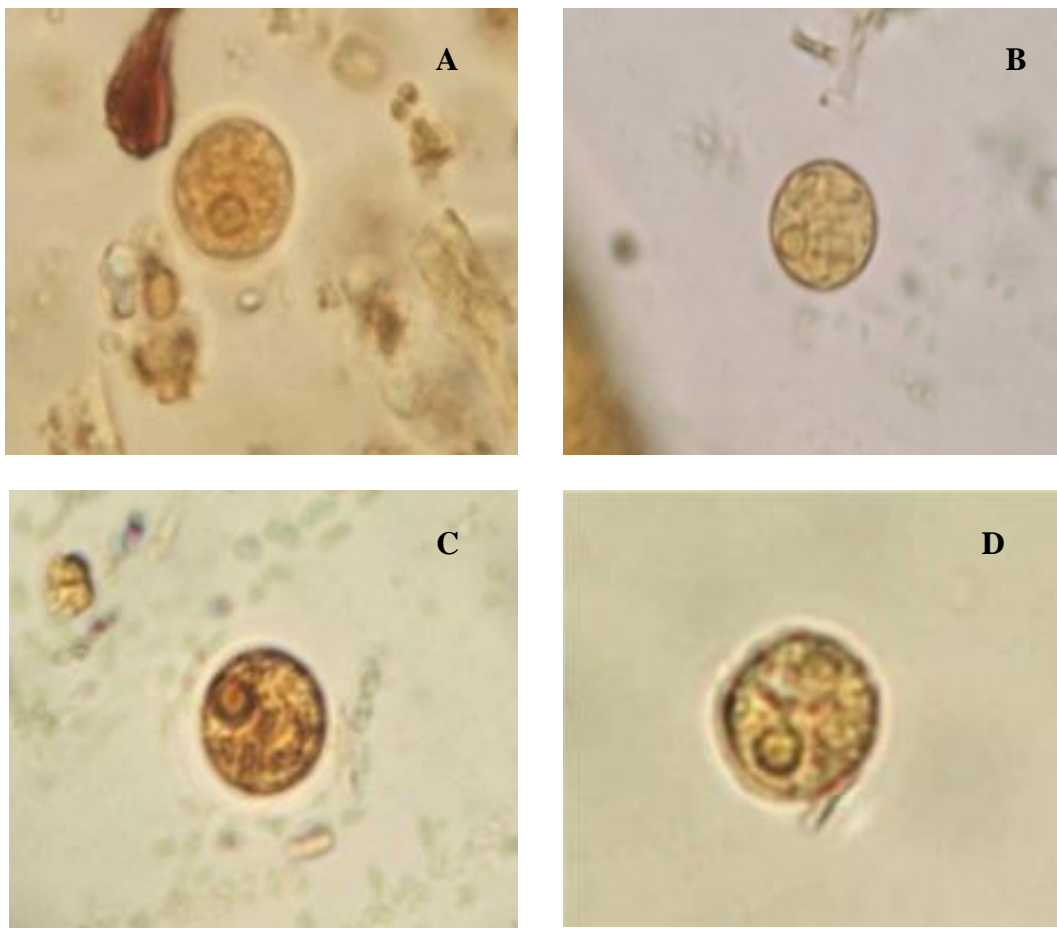


Figura 4. Imágenes obtenidas por microscopía óptica a 100x. A) Quiste uninucleado de *Entamoeba* aislado en guanaco B) Quiste uninucleado de *Entamoeba* aislado en

jirafa. C) Quiste uninucleado de *Entamoeba* aislado en gacela dama D) Quiste uninucleado de *Entamoeba* aislado en bisonte europeo

2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *ENTAMOEBAS*

Un total de 43 muestras positivas obtenidas de 32 especies de hospedador fueron analizadas molecularmente. Las especies de *Entamoeba* identificadas a partir de las secuencias parciales obtenidas del gen ARNr 16s quedan reflejadas en la Tabla 2. Solo aquellas secuencias que presentaban un porcentaje de similitud igual o superior 96% con la secuencia de referencia del GenBank se consideró que habían sido identificadas y no se realizaron más análisis (Tabla 2). En aquellos casos en los que el porcentaje fue inferior o no coincidía con ninguna de las secuencias ya depositadas, se amplificó el gen ARNr 16s completo (Tabla 3).

Especies de Entamoeba identificadas en galliformes

Tanto la secuencia obtenida de pintada como la secuencia de gallina, tenían un porcentaje de homología muy bajo como para identificarla como *E.coli* (AF149915). La secuenciación del gen completo permitió obtener una nueva secuencia, identificada como de *E. gallinarum*, que todavía no está depositada en la base de datos del GenBank.

Especies de Entamoeba identificadas en struthioniformes

En el hospedador *Rhea americana* se identificaron las especies: *E. suis* (DQ286372) y *E. dispar* (Z49256).

Especies identificadas en primates

Las secuencias parciales obtenidas de chimpancé, mandril, papión y macaco presentaban una alta homología con *E. coli* (AF149914, FN396614 y AF149915). Solo la secuencia obtenida de colobo era prácticamente idéntica a *E. dispar*.

Especies identificadas en artiodáctilos

En artiodáctilos rumiantes, la mayoría de las secuencias parciales obtenidas mostraban un alto porcentaje de homología ($\geq 96\%$) con *E. bovis*. Además se observó que las diferentes secuencias obtenidas de *E. bovis* era genéticamente distintas en función del hospedador:

- La secuencia tipo 1 (FN666248) se identificó en: cabras y vacas.
- La secuencia tipo 2 (FN666249) se identificó en: antílopes, bisontes, búfalos, vaca y ciervo español.
- La secuencia tipo 3 (FN666250) se identificó en: cabras, corzos, nilgos, guanacos y oryx.
- La secuencia tipo 4 (FN666251) se identificó únicamente en las muestras de takín.
- La secuencia tipo 5 (FN666252) se identificó únicamente en las muestras de cabra.

El resto de las secuencias parciales de artiodáctilos rumiantes presentaban un porcentaje de similitud bajo ($\leq 87\%$) con la secuencia *Entamoeba* sp. RL3 (FR686359.1), por lo que se obtuvo la secuencia completa del gen y se observó que era distinta a las ya descritas en el GenBank, sin embargo, presentaba cierta similitud con *E. bovis*. Dado que esta secuencia ha sido obtenida de quistes de un tamaño menor que los de *E. bovis*, se ha asignado a *E. ovis*, y no está depositada todavía en el GenBank.

En los artiodáctilos no rumiantes, es decir, los suidos (cerdos, jabalís y babirusas), la especie presente en los tres hospedadores fue *E. struthionis* (AJ566411). Además en el cerdo también se aisló la especie *E. polecki* (AF149913).

Hospedador	Sp. identificada por microscopía	Sp. identificada por Genbak	% de similitud	N° de pares idénticas /N° total de bases
AVES				
Galliformes				
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (AF149915)	75%	566/722
Pintada (<i>Numida meleagris</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (AF149915)	79%	670/827
Struthioniformes				
Ñandú (<i>Rhea americana</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. suis</i> (DQ286372)	99%	652/658
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo anatis</i>	<i>E. dispar</i> (Z49256)	100%	800/800
MAMÍFEROS				
Artiodáctilos rumiantes				
Antilope (<i>Antilope sp.</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	99%	548/559
Bisonte americano (<i>Bison bison</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	99%	537/540
Bisonte Europeo (<i>Bison bonasus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	99%	670/685
Búfalo Rojo (<i>Synceurus caffer namus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	99%	662/682
Cabra (<i>Capra aegagrus</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	99%	632/639
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666252)	83%	731/877
Muestra 3	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666252)	98%	236/237
Muestra 4	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666248)	96%	280/290
Cervicapra (<i>Antilope cervicapra</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	85%	580/679
Ciervo Español (<i>Cervus elaphus</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	83%	290/340
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	100%	350/350
Ciervo Padre David (<i>Elaphurus davidianus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666251)	96%	655/662
Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	85%	588/691
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	90%	597/681
Gacela Dorca (<i>Gazella dorcas</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	85%	581/680
Gamo (<i>Dama dama</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	82%	360/442
Gaur (<i>Bos gaurus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666252)	90%	360/442
Guanaco (<i>Lama guanicoe</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	96%	605/687
Jirafa (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	86%	290/340
Muntjacs (<i>Muntiacus sp.</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	100%	350/350
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666251)	87%	389/446
Nilgo (<i>Boselaphus tragocamelus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	99%	665/674
Oryx (<i>Oryx sp.</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	95%	395/401
Oveja (<i>Ovis orientalis aries</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686359)	94%	354/376
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666250)	70%	461/658
Reno (<i>Rangifer tarandus</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686358)	85%	586/686
Sitatunga (<i>Tragelaphus speki</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>Entamoeba sp. RL3</i> (FR686358)	85%	582/681
Takín (<i>Budorcas taxicolor</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666251)	87%	655/655
Vaca (<i>Bos primigenius taurus</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666249)	98%	634/647
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. bovis</i> (FN666248)	98%	506/507
Artiodáctilos no rumiantes				
Babirusa (<i>Babirusa babirusa</i>)	<i>Entamoeba tipo bovis</i>	<i>E. struthionis</i> (AJ566411)	100%	687/687
Cerdo (<i>Sus scrofa domestica</i>)				
Muestra 1	<i>Entamoeba tipo polecki</i>	<i>E. struthionis</i> (AJ566411)	100%	989/989
Muestra 2	<i>Entamoeba tipo polecki</i>	<i>E. polecki</i> (AF149913)	97%	586/686
Jabali (<i>Sus scrofa</i>)	<i>Entamoeba tipo polecki</i>	<i>E. struthionis</i> (AJ566411)	99%	638/645
Primates				
Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (AF149915)	99%	337/391
Colobo (<i>Colobus sp.</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. dispar</i> (Z49256)	100%	989/989
Macaco (<i>Macaca mulatta</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (FN396614)	97%	577/654
Mandrill (<i>Mandrillus sphinx</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (AF149914)	99%	537/541
Papión (<i>Papio sp.</i>)	<i>Entamoeba tipo coli</i>	<i>E. coli</i> (AF149914)	97%	346/349

Tabla 2. *Entamoeba* sp. Identificadas morfológica y molecularmente en el estudio.

Hospedador	Sp. identificada
Gallina, Pintada	<i>E. gallinarum</i>
Ñandú, Cabra, cervicapra, ciervo español, corzo, gacela dorca, Gamo, jirafa, oveja,	<i>E. ovis</i>

Tabla 3. Secuencia completa obtenida del gen ARNr-16s.

3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Mediante el análisis filogenético de las secuencias del gen codificante del ARNr 16S se determinaron las relaciones evolutivas entre las especies del género *Entamoeba*. El análisis de ML (Fig. 5) y MP (Fig. 6) mostraron resultados muy similares, pudiéndose observar en ambos modelos los cuatro grupos de *Entamoeba* (*gingivalis*, *bovis*, *histolytica* y *coli*) bien diferenciados, con algunas excepciones.

El análisis de ML reveló que las especies uninucleadas identificadas en artiodáctilos rumiantes (*E. bovis* y *E. ovis*) forman un clado íntimamente relacionado con el grupo *histolytica*, y a su vez separado del resto de especies uninucleadas (*E. suis*, *E. polecki*, *E. struthionis* y *E. chattoni*) y del grupo *coli*. En cuanto a las especies del grupo *bovis* identificadas en perisodáctilos y suidos (*E. polecki*, *E. struthionis* y *E. chattoni*) el árbol filogenético (Fig. 5) muestra como forman un subgrupo relacionado con las especies del grupo *coli*. Y por último, *E. suis* formarían un subgrupo separado con *E. gingivalis*.

En cuanto al grupo *histolytica*, se puede observar como las especies *E. histolytica*, *E. nuttalli*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi* y *E. ecuadoriensis* se localizan en ramas distintas de las especies: *E. insolita*, *E. terrapinae*, *E. invadens*, *E. ranarum*, *E. equi* y *E. hartmanni*. Y en el caso de la especie *E. marina*, descrita recientemente, no formaría un clado con el grupo *histolytica*.

Por último, ambos modelos revelan como el grupo *coli*, formado por las especies *E. muris*, *E. gallinarum* y *E. coli*, se encuentra bien diferenciado del resto de grupos de *Entamoeba*.

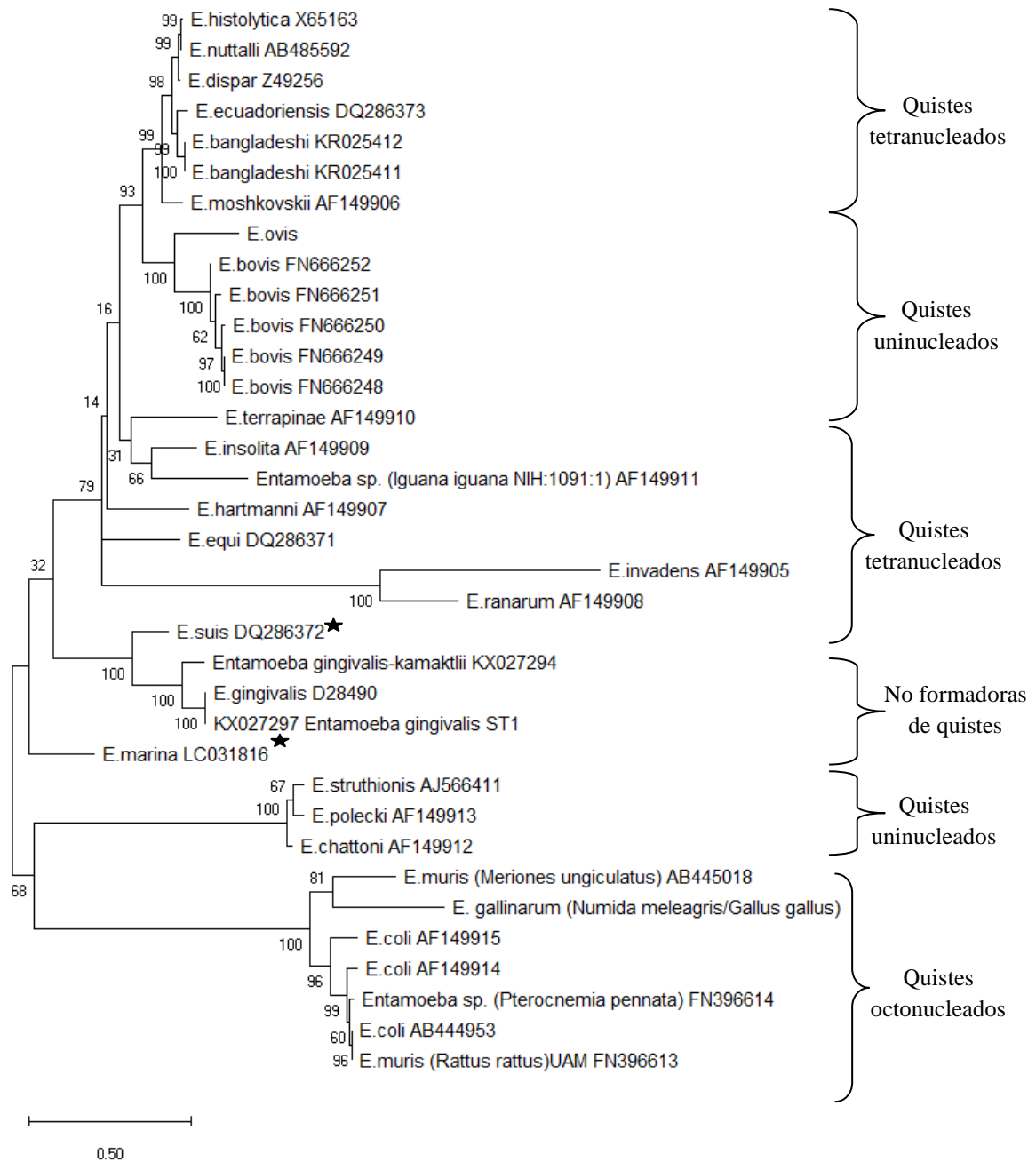


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre especies del género *Entamoeba* mediante análisis de la secuencia del gen codificante del ARNr 16s. El análisis de ML utilizó el Modelo general de sustitución de nucleótidos reversible en el tiempo con distribución gamma (GTR+G) y con un soporte estadístico basado en 1000 réplicas (bootstrap). Las especies marcadas son *E. marina* y *E. suis*, perteneciente al grupo *histolytica* y *bovis* respectivamente.

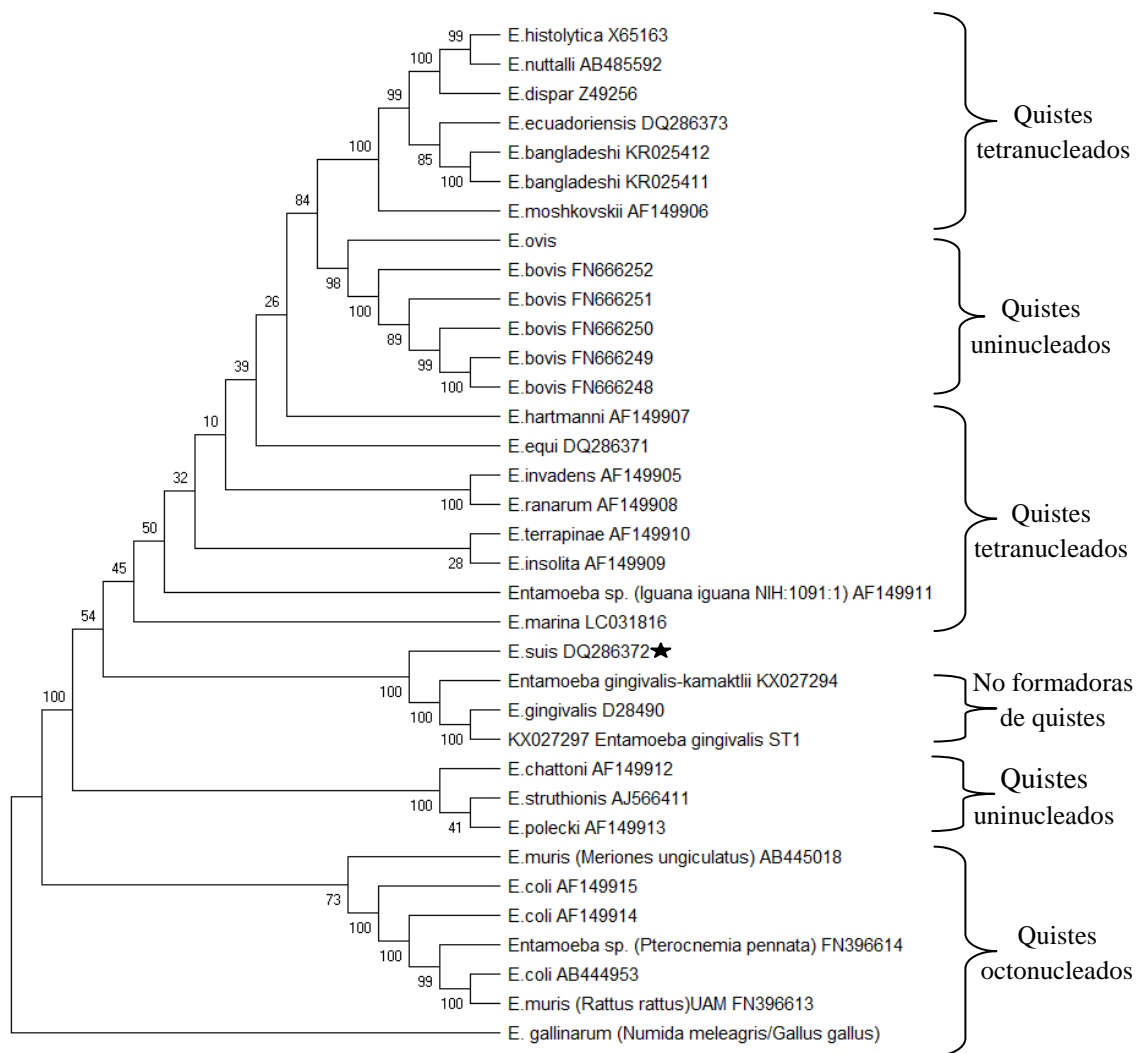


Figura 6. Relaciones filogenéticas entre especies del género *Entamoeba* mediante análisis de la secuencia del gen codificante del ARNr 16s. El análisis de MP utilizó un soporte estadístico basado en 1000 réplicas (bootstrap). La especie marcada (*E. suis*) se agrupa con el grupo *gingivalis*, pero es una especie uninucleada.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, los quistes de *Entamoeba* identificados en las heces de diferentes hospedadores criados en cautividad fueron analizados microscópicamente y molecularmente. La identificación de las especies de *Entamoeba* basada en los caracteres morfológicos de los quistes maduros en combinación con la especie de hospedador no fue del todo válida, ya que existía una gran diversidad genética entre organismos morfológicamente idénticos (Clark et al., 2006; Stensvold et al., 2010). Por ejemplo; *E. bovis* y *E. ovis* son morfológicamente muy parecidas y además comparten hospedadores, sin embargo genéticamente muestran suficientes diferencias para

considerarlas organismos independientes. Lo mismo ocurre con *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, que presentan una morfología idéntica, pero bioquímica y genéticamente son diferentes (Sard et al., 2011; Shimokawa et al., 2015).

Por ello, la comparación de las secuencias del gen codificante del ARNr 16s es esencial para realizar estudios taxonómicos y filogenéticos más fiables. En ambos casos, la base de un buen análisis parte de la calidad del alineamiento de las secuencias que permite que los resultados obtenidos sean válidos. Así pues, en el presente trabajo a la hora de realizar el alineamiento múltiple de todas las secuencias de *Entamoeba* se tuvo en cuenta la estructura secundaria del gen codificante del ARNr 16s. Dado que en las secuencias encontramos zonas constantes, nos fijamos en las regiones hipervariables para identificar las similitudes y diferencias entre las especies de *Entamoeba*.

Las aves suelen ser hospedadores de una gran variedad de parásitos, incluido el género *Entamoeba*. Únicamente se han descrito tres especies de *Entamoeba* capaces de infectar aves y son: *E. gallinarum* aislada en gallina, pavo, pintada, pato y ganso; *E. anatis* aislada en patos; y *E. struthionis* en avestruces (Levine, 1985; Silvanose et al., 1998; Martínez-Díaz et al., 2000; Ponce Gordo et al. 2004). Pero este estudio ha revelado que además de las especies anteriormente citadas, las aves (*Rhea americana*) también podrían infectarse con *E. dispar* y *E. suis*, descritas en primates no humanos, primates y suidos respectivamente (Clark et al, 2007). En *Rhea americana* han sido descrito numerosos protozoos incluido *Entamoeba sp.* y *E. struthionis* (Ponce-Gordo et al., 2002; Ponce-Gordo et al., 2004; Martínez-Díaz et al., 2012).

En las muestras de primates no humanos también es frecuente encontrar quistes de diversas especies de *Entamoeba* (Levecke et al., 2010; Berrilli et al., 2011). Estudios recientes han indicado como las especies: *E. chattoni*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. dispar*, *E. nuttalli* o *E. histolytica*, son capaces de infectar a primates no humanos criados en cautividad; como macacos, chimpancés, lémures o babuinos (Verweij et al., 2003; Chinchilla-Carmona et al, 2005; Levecke et al., 2010; Berrilli et al., 2011). Por tanto, no es de extrañar la presencia de *E. coli* y *E. dispar* en las muestras de primates del presente trabajo.

En perisodáctilos a pesar de que no se han encontrado formas parasitarias de *Entamoeba*, sí se han hallado otros protozoos como ciliados en las muestras de cebra. Sin embargo, algunos autores han descrito especies del grupo *histolytica* (*E. equi*) y del grupo *coli* (*E. gedoelsti*) en caballos (Fantham, 1921; Hsiung, 1930).

Hasta la fecha en artiodáctilos rumiantes únicamente se han descrito especies de *Entamoeba* formadoras de quistes uninucleados (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010). En el presente estudio, según los análisis genéticos la especie mayoritaria identificada en las muestras de rumiantes fue *E. bovis*, esta especie ha sido descrita exclusivamente en: renos, ciervos y en ganado vacuno, ovino y caprino (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010; Stensvold et al., 2010; Stensvold et al., 2011; Al-Habsi et al., 2017; Matsubayashi et al., 2018). Sin embargo, los resultados de este estudio revelan que *E. bovis* podría infectar a otros rumiantes como: antílopes, bisontes, corzos, nilgos, oryxes, takines y guanacos. Por otro lado, los resultados genéticos mostraron que existían diferentes tipos o variantes de *E. bovis*, y que éstas infectan a determinados tipos de hospedador. Otra de las especies identificadas del grupo *bovis* fue *E. ovis*, descrita por primera vez en ovejas por Swellengrebel (1914). Esta especie ha sido descrita por otros autores en ganado ovino y caprino (Ponce-Gordo et al., 2007), pero a la vista de los resultados de este estudio, *E. ovis* podría infectar también a otros rumiantes: ciervos, corzos, gacelas, cervicapras, gamos, jirafas y sitatungas. Por tanto, *E. bovis* y *E. ovis* tendrían una gran variedad de hospedadores, todos ellos artiodáctilos rumiantes.

En artiodáctilos no rumiantes (suidos) también es frecuente encontrar en las muestras fecales quistes uninucleados de *Entamoeba*, siendo las especies más habituales *E. polecki* y *E. suis* (Clark et al., 2007; Matsubayashi et al., 2014). La validez de alguna de las especies descritas en suidos ha sido objeto de discusión, ya que en algunos casos la especie de hospedador ha sido determinante para identificar y diferenciar especies morfológicamente idénticas. Tal es el caso de *E. chattoni* que presenta una morfología muy similar a *E. polecki*, pero se ha mantenido como especie diferente debido al diferente tipo de hospedador (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010).

En este estudio *E. polecki* fue aislada de las muestras de cerdo, se trata de una especie comensal descrita originalmente en cerdos (von Prowazek, 1911). También se identificó *E. struhtionis*, que a pesar de ser una especie originalmente descrita en aves (Ponce-Gordo et al., 2004), otros estudios también han avalado su presencia en mamíferos (cerdos) (Clark et al., 2007; Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010). Por lo tanto, los resultados sugieren que ambas especies (*E. struhtionis* y *E. polecki*) tienen baja especificidad de hospedador, y pueden infectar también a suidos y perisodáctilos respectivamente.

En cuanto a los análisis filogenéticos, el presente estudio; así como el resto de trabajos publicados sobre la filogenia de *Entamoeba*, reflejan como las especies del grupo *coli* forman un grupo monofilético claramente separado del resto de especies de *Entamoeba*. Por otra parte, el modelo de MP mostró como las diferentes secuencias obtenidas de *E. bovis*, junto con *E. ovis* se agrupan formando un clado relacionado con el grupo *histolytica*. Lo que sugiere que las especies aisladas en rumiantes habrían evolucionado desde un antecesor formador de quistes tetranucleados. En cuanto a las especies *E. polecki*, *E. struthionis* y *E. chattoni*, formarían un subgrupo filogenéticamente emparentado con el grupo *coli*. De forma que las especies aisladas en artiodáctilos rumiantes se encontrarían separadas genéticamente de las especies aisladas en suidos, aves y primates (salvo *E. suis*), y por tanto siendo evidente que el grupo de especies uninucleadas es polifilético (Ponce-Gordo et al., 2007; Stensvold et al., 2010).

En cuanto al grupo *histolytica* en este estudio podemos ver como las especies identificadas en hospedadores homeotermos (*E. histolytica*, *E. nutalli*, *E. dispar* y *E. bangladeshi*) se localizan en ramas distintas de las especies de hospedadores poiquilotermos (*E. insolita*, *E. terrapinae*, *E. invadens* y *E. ranarum*). En la actualidad todavía existe cierta controversia sobre las posiciones que ocupan en el árbol filogenético *E. hartmanni*, *E. equi* y las especies de hospedadores poiquilotermos (anfibios y reptiles). Ya que la posición de estas varía entre los diferentes estudios filogenéticos (Stensvold et al., 2011; Alfonso et al., 2012; García et al., 2013; Shiratori y Ishida, 2015; Jacob et al., 2016; Matsubayashi et al., 2017). Al igual que los resultados obtenidos por Clark et al., (2006), *E. hartmanni* y *E. equi*, que son especies comensales del hombre y de caballos respectivamente, estarían en una rama separadas de las especies de hospedadores homeotermos, pero claramente pertenecerían al grupo *histolytica*.

Lo mismo ocurre con las especies de vida libre: *E. ecuadoriensis* y *E. moshkovskii*, las cuales han sido aisladas en aguas residuales (Clark y Diamond, 1997; Tshalaia 1941; Fonseca et al., 2016). *Entamoeba ecuadoriensis* sería la especie más estrechamente relacionada con *E. histolytica* y *E. dispar*. Además en el caso de *E. moshkovskii* algunos estudios han indicado su implicación en alteraciones gastrointestinales en el hombre (Sard et al., 2011; Shimokawa et al., 2015). En el caso de la especie *E. marina*, descrita recientemente, filogenéticamente estaría separada del resto de especies tetranucleadas, ya que se trata de una especie de vida libre aislada en sedimentos marinos (Shiratori y

Ishida, 2016). Así pues, a la vista de los resultados filogenéticos, las especies tetranucleadas también formarían un grupo polifilético.

Y por último, al igual que en los análisis filogenéticos realizados por Clark et al., (2006) la especie *E. gingivalis* conformaría un clado con *E. suis* (grupo *bovis*) que es basal al clado formado por las especies del grupo *histolytica* (Ponce-Gordo y Martínez-Díaz, 2010). Esto supondría en primer lugar que *E. suis* difiere del resto de especies uninucleadas. Y en segundo lugar, *E. gingivalis* deriva de un antecesor formador de quistes uninucleados y que en un momento de la evolución perdió la capacidad de formar quistes. Por lo tanto, significa que el grupo *gingivalis* formarían un grupo paraflético (Clark et al., 2006).

Por tanto, se puede confirmar que la agrupación de especies basada en los caracteres morfológicos de los quistes maduros (principalmente en función del número de núcleos) no siempre refleja las verdaderas relaciones filogenéticas.

CONCLUSIONES

- La morfología que presentan los quistes maduros en combinación con la especie de hospedador; han sido la base de la clasificación e identificación de las especies de *Entamoeba*. Sin embargo, estos criterios no son siempre válidos. Por tanto, es necesario recurrir a las técnicas moleculares como la secuenciación del gen codificante del ARNr 16s para identificar las especies del género *Entamoeba*.
- Algunas especies del género *Entamoeba* pueden infectar a diversos hospedadores rumiantes, y dentro de un mismo hospedador rumiante podemos encontrar más de una especie distinta.
- Las diferentes especies de *Entamoeba* son específicas de determinados grupos de animales (ungulados, primates, aves) :
 - *Entamoeba tipo coli*: primates, galliformes.
 - *Entamoeba tipo bovis*: artiodáctilos rumiantes
 - *Entamoeba tipo polecki*: primates, struthioniformes, artiodáctilos no rumiantes (suidos).
 - *Entamoeba tipo histolytica*: primates.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexeieff, A. (1912). Sur les caracteres cytologiques et la systematique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrés (*Proctamoeba* nov. gen.). *Bull Soc Zool France* 37: 55.
- Alfonso, S., Martínez-Díaz, R. A., y Ponce-Gordo, F. (2012). Estructura secundaria y mapa de variabilidad de la subunidad pequeña del ARNr de *Entamoeba*. Posibles implicaciones para la taxonomía del género. *Revista Ibero-Latinoam Parasitol*, 71, 125-137.
- Ali, I. K. M., Hossain, M. B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P. F., Petri Jr, W. A., Haque, R., y Clark, C. G. (2003). *Entamoeba moshkovskii* infections in children in Bangladesh. *Emerging infectious diseases*, 9(5), 580.
- Al-Habsi, K., Yang, R., Ryan, U., Jacobsen, C., y Miller, D. W. (2017). Morphological and molecular characterization of an uninucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. in captured Rangeland goats in Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 235, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.013>
- Bailenger, J. (1963), *Coprologie parasitaire et fonctionelle*, Bailenger (Ed), Bordeaux, 324p.
- Berrilli, F., Prisco, C., Friedrich, K. G., Di Cerbo, P., Di Cave, D., y De Liberato, C. (2011). *Giardia duodenalis* assemblages and *Entamoeba* species infecting non-human primates in an Italian zoological garden: Zoonotic potential and management traits. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-199>.
- Becker, E. R. (1926). *Endamoeba citelli* sp. nov. from the striped ground squirrel *Citellus tridecemlineatus*, and the life-history of its parasite, *Sphaerita endamoebae* sp. nov. *The Biological Bulletin*, 50(6), 444-454.
- Bonner, M., Fresno, M., Gironès, N., Guillen, N., y Santi-Rocca, J. (2018). Reassessing the Role of *Entamoeba gingivalis* in Periodontitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8.

- Bullock, W. L. (1966). *Entamoeba gadi* sp. n. from the rectum of the pollock, *Pollachius virens* (L., 1758), with some observations on its cytochemistry. *The Journal of parasitology*, 679-684.
- Chatton, E. (1918). L'amibiase intestinale experimentale du cobaye a *Entamoeba dysenteriae*. Ses caracteres speciaux: localisation caecale, absence de dysenterie, importantes reactions hyperplasiques. *Arch. Inst. Pasteurs*, 10, 138.
- Cheng, T. C. (2012). *General parasitology*. Elsevier.
- Chen, C. (1956). The protozoan parasites from four species of Chinese pond fishes: *Ctenopharyngodon idellus*, *Mylopharyngodon piceus*, *Aristichthys nobilis* and *Hypophthalmichthys molitrix* II. *The protozoan parasites of Mylopharyngodon piceus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2, 296.
- Chia, M. Y., Jeng, C. R., Hsiao, S. H., Lee, A. H., Chen, C. Y. y Pang, V. F. (2009). *Entamoeba invadens* myositis in a commonwater monitor lizard (*Varanus salvator*). *Vet. Pathol.*, 46:673–676.
- Chinchilla Carmona, M., Guerrero Bermúdez, O., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Sánchez Porras, R., y Rodríguez Ortiz, B. (2005). Parásitos intestinales en monos congo *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 437-445.
- Clark, C. G., y Diamond, L. S. (1997). Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(2), 142–154. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05951.x>.
- Clark, C. G., Kaffashian, F., Tawari, B., Windsor, J. J., Twigg-Flesner, A., Davies-Morel, M. C. y Jackson, C. J. (2006). New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2235–2239. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64208-0>.
- Clark, CG., Windsor, JJ., Tannich, E. (2007). On the identification of some *Entamoeba* species -response to Ponce-Gordo and Martínez-Díaz. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1176.

- da Cunha, A. M., & Penido, J. C. N. (1926). *Entamoeba pimelodi* n. sp., parasite d'un poisson d'eau douce. *CR Soc Biol Paris*, 95, 1010-1011.
- Fantham, H. B. (1921). Some parasitic Protozoa found in South Africa. V. *South African Journal of Science*, 18: 164-170
- Fantham, H. B. (1923). Some parasitic Protozoa found in South Africa. VI. *South African Journal of Science*, 20: 493-500.
- Fantham, H. B. (1924). Some parasitic Protozoa found in South Africa. VII. *South African Journal of Science*, 21: 435-444.
- Fonseca, J. A., Heredia, R. D., Ortiz, C., Mazo, M., Clavijo-Ramírez, C. A., y Lopez, M. C. (2016). Identification of *Entamoeba moshkovskii* in treated waste water used for agriculture. *EcoHealth*, 13(1), 156-160.
- Galli-Valerio B. (1935). Notes parasitologiques. *Schweiz. Arch Tierheilk* 77: 643.
- García, G., Ramos, F., Pérez, R. G., Yañez, J., Estrada, M. S., Mendoza, L. H., y Gaytán, P. (2014). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Entamoeba* species in a chelonian collection. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 2), 271–283. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.061820-0>.
- Grassi, G. B. (1879). Dei Protozoi parassiti e specialmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz Med Ital-Lombard* 39: 445-449.
- Gros G. (1849). Fragments d'helminthologie et de physiologie microscopique. *Bull Soc Imp Nat Moscow* 22: 549-573.
- Hatta, T., Teramoto, I., Nukata, S., Uni, S., Matsuura, Y., Tsuji, N., y Sasai, K. (2017). First detection and molecular identification of *Entamoeba bovis* from Japanese cattle. *Parasitology Research*, 117(1), 339–342. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5689-2>.
- Heredia, R. D., Fonseca, J. A. y Lopez, M. C. 2012. *Entamoeba moshkovskii* perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis. *Acta Trop.*, 123:139–145.

- Holmes, F. O. (1923). Observations on the cysts of *Endamoeba cobayae*. *The Journal of Parasitology*, *10*(1), 47-50.
- Jacob, A. S., Busby, E. J., Levy, A. D., Komm, N., y Clark, C. G. (2016). Expanding the Entamoeba Universe: New Hosts Yield Novel Ribosomal Lineages. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *63*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1111/jeu.12249>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* *35*:1547-1549.
- Lavier, G. (1928). Entamoeba varani n. sp. amibe parasite de reptile. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, *6*(2), 152-154.
- Levecke, B., Dreesen, L., Dorny, P., Verweij, J. J., Vercammen, F., Casaert, S., y Geldhof, P. (2010). Molecular identification of Entamoeba spp. in captive nonhuman primates. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(8), 2988–2990. <https://doi.org/10.1128/JCM.00013-10>.
- Levine ND. 1985. Veterinary Protozoology. Iowa State University Press, Ames.
- Hsiung, T. S. (1930). A monograph on the protozoa of the large intestine of the horse.
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., y Rezaeian, M. (2015). An Annotated checklist of the human and animal entamoeba (Amoebida: Endamoebidae) species-A review article. *Iranian journal of parasitology*, *10*(2), 146.
- Martínez-Díaz, R. A., Herrera, S., Castro, A., y Ponce, F. (2000). Entamoeba sp.(Sarcocystis: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*)(Aves: Struthionidae). *Veterinary parasitology*, *92*(3), 173-179. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00314-9)
- Martínez-Díaz, R. A., Martella, M. B., Navarro, J. L., y Ponce-Gordo, F. (2013). Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. *Veterinary Parasitology*, *194*(1), 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.021>.
- Martínez-Díaz, R. A., Castellón, A. T. C., Corraleche, L., Pérez, C., y Gordo, F. P. (2000). Prevalencia de las parasitosis por " cryptosporidium", " balantidium" y "

- entamoeba" en granjas de avestruces en España. En: *Globalización medioambiental: perspectivas agrosanitarias y urbanas: Actas del I Congreso Internacional de Veterinaria y Medio Ambiente: Madrid, octubre 1998* (pp. 395-398). Secretaría General Técnica.
- Matsubayashi, M., Matsuura, Y., Nukata, S., Daizi, Y., Shibahara, T., Teramoto, I., y Tsuji, N. (2018). First detection and molecular identification of *Entamoeba bovis* from Japanese cattle. *Parasitology research*, *117*(1), 339-342.
- Matsubayashi, M., Suzuta, F., Terayama, Y., Shimojo, K., Yui, T., Haritani, M., y Shibahara, T. (2014). Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: Implications for pathogenicity. *Parasitology Research*, *113*(8), 3023–3028. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3965-y>.
- Nakada-Tsukui, K., y Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, *7*, 175.
- Noble, E.R., y Noble, G.A. (1966). Amebic parasites of fishes. *J Prot* *13*: 478-480.
- Orias, J. D., y Noble, E. R. (1971). *Entamoeba nezumia* sp. n. and other parasites from a North Atlantic fish. *The Journal of parasitology*, 945-947.
- Papazahariadou, M., Diakou, A., Papadopoulos, E., Georgopoulou, I., Komnenou, A., y Antoniadou-Sotiriadou, K. (2008). Parasites of the digestive tract in free-ranging birds in Greece. *Journal of Natural History*, *42*(5–8), 381–398.
- Petri, W. A., Royer, T. L., Gilchrist, C., Kabir, M., Arju, T., Ralston, K. S., y Clark, C. G. (2012). *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(9), 1543–1545. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120122>
- Ponce-Gordo, F., Herrera, S., Castro, A. T., García-Durán, B., y Martínez-Díaz, R. (2002). Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology*, *107*(1-2), 137-160.
- Ponce-Gordo, F., Martínez Díaz, R. A., y Herrera, S. (2004). *Entamoeba struthionis* n.sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Parasitology*, *119*(4), 327–335.

- Ponce-Gordo, F., y Martínez-Díaz, R. A. (2010). Taxonomía y Filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 69, 5–37.
- Ponce-Gordo, F., Jiménez-Ruiz, E., y Martínez-Díaz., RA. (2007). Relaciones filogenéticas entre las especies del género *Entamoeba*: una revisión basada en el análisis de nuevas secuencias. Actas del X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10), 2007 Madrid. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid.
- Prowazek SV. 1912. *Entamoeba*. Arch Protistenkd 25: 273-274.
- Regan, C. S., Yon, L., Hossain, M., y Elsheikha, H. M. (2014). Prevalence of *Entamoeba* species in captive primates in zoological gardens in the UK. *PeerJ*, 2, e492
- Sard, B. G., Navarro, R. T., y Esteban Sanchis, J. G. (2011). Amebas intestinales no patógenas: una visión clinicoanalítica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 3), 20–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70023-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70023-4).
- Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Schultz J y M Wolf (2006): 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:498.
- Shiratori, T., y Ishida, K. I. (2016). *Entamoeba marina* n. Sp.; A New Species of *Entamoeba* Isolated from Tidal Flat Sediment of Iriomote Island, Okinawa, Japan. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(3), 280–286. <https://doi.org/10.1111/jeu.12276>
- Stensvold, C. R., Lebbad, M., y Clark, C. G. (2010). Genetic characterisation of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* spp. from ruminants. *International Journal for Parasitology*, 40(7), 775–778. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.03.003>
- Stensvold, C. R., Lebbad, M., Victory, E. L., Verweij, J. J., Tannich, E., Alfellani, M., y Clark, C. G. (2011). Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: Consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular

detection. *Protist*, 162(3), 525–541. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.11.002>.

Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., Ali, I. K. M., ... y Petri Jr, W. A. (2012). *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *The Journal of infectious diseases*, 206(5), 744-751.

Swellengrebel N. H. 1914. Dierlijke entamoeben uit Deli. *Geneesk Tijdschr V Nederl-Indië* 54: 420-426.

Taliaferro, W. H., y Holmes, F. O. (1924). *Endamoeba barreti*, n. sp., from the turtle, *Chelydra serpentina*; a description of the amoeba from the vertebrate host and from Barret and Smith's cultures. *American Journal of Epidemiology*, 4(3), 160-168.

Tshalaia, L E. 1941. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. *Med Parazit (Moscow)* 10: 244-252.

Verweij, J. J., Brienen, E. A. T., Blotkamp, C., Laeijendecker, D., Van Lieshout, L., Polderman, A. M., y Vermeer, J. (2003). *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitology Research*, 90(2), 100–103. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0808-z>

Verweij, J. J., Polderman, A. M., y Clark, C. G. (2001). Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. *Journal of clinical microbiology*, 39(4), 1644-1646. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1644-1646.2001>.

Wood, W. F. (1935). Some observations on the intestinal protozoa of Californian lizards. *The Journal of Parasitology*, 21(3), 165-174.