

## Asymptomatic amoebic infection: *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar*? That is the question.

S. Gatti (1), J. C. Petithory (2), F. Ardoin (2), C. Pannetier (3) & M. Scaglia (4)

(1) Parasitology Laboratory, Virology Service, IRCCS San Matteo, Pavia, Italy.

(2) Qualité en Parasitologie et Biologie, Département Emile Brumpt, Lab., Centre hospitalier, Gonesse, France.

(3) Service de gastro-entérologie, Centre hospitalier, Gonesse, France.

(4) Department of Infectious Diseases and Infectious Diseases Research Labs, University-IRCCS San Matteo, viale Taramelli 5, 27100 Pavia, Italy. Tel.: 00 39 0382/502698-9. Fax: (0039) 0382/423320. E-mail: mscaglia@smatteo.pv.it

Manuscrit n°2272. "Parasitologie". Reçu le 16 janvier 2001. Accepté le 11 septembre 2001.

**Résumé :** Infection amibienne asymptomatique par *Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar* ?

*Entamoeba dispar* a été découvert par Emile BRUMPT en 1925 (1). Il s'agit d'une espèce d'amibe morphologiquement très proche d'*Entamoeba histolytica*, mais non pathogène (14, 32, 33).

Les études épidémiologiques antérieures à 1990 confondent ces deux espèces. C'est ainsi qu'en 1988, WALSH estimait la prévalence mondiale d'*E. histolytica* à 480 millions de porteurs, dont 36 millions présentaient des signes cliniques, et 40 à 80 000 décès par an (30).

Sur la base de travaux récents, les données sur la distribution géographique de cette endémie doivent être revues (11, 18). La prévalence d'*E. histolytica* peut être ramenée à 50 millions de cas, tandis que 450 millions d'individus sont porteurs d'*E. dispar*. Ces deux espèces sont cosmopolites mais leurs prévalences sont aujourd'hui beaucoup plus élevées en zone tropicale que dans les pays industrialisés, en raison des faibles progrès accomplis dans le domaine de l'hygiène par les pays en développement. Dans les pays industrialisés, la majorité des cas sont diagnostiqués chez les immigrants et chez les touristes ayant séjourné dans des pays de forte endémicité amibienne auxquels il faut ajouter 2 catégories à risque : les homosexuels, VIH négatifs ou positifs, et les pensionnaires des institutions pour malades mentaux (4, 7, 8, 12, 13, 27).

La première méthode de laboratoire reproductible utilisée pour différencier *E. histolytica* et *E. dispar* a été l'électrophorèse d'isoenzymes (26). Cette technique permet d'identifier toutes les souches d'*E. histolytica/E. dispar* sur la base des bandes de précipités de quatre enzymes glycolytiques (malique enzyme = ME, phosphoglucomutase = PGM, glucose phosphate isomérase = GPI, hexokinase = HK) et de les classer en 21 zymodèmes différents : 9 pathogènes pour *E. histolytica* et 12 non pathogènes pour *E. dispar* (23). Récemment, des techniques de biologie moléculaire ont confirmé qu'*E. histolytica* et *E. dispar* étaient bien deux espèces différentes (3, 18, 28).

Des méthodes de diagnostic rapides, basées sur la détection de coproantigènes spécifiques (lectine galactose inhibitrice) d'*E. histolytica* et d'*E. histolytica/E. dispar* ont été développées. Les résultats sont d'une sensibilité et d'une spécificité prometteuses, bien supérieures à celles obtenues en France, par exemple, dans les tests du contrôle national de qualité en parasitologie au cours desquels des kystes d'*E. histolytica/E. dispar* n'ont été correctement diagnostiqués que par 33,7 % des participants et diagnostiqués à tort comme des kystes d'*Entamoeba coli* par 32,2 % d'entre eux (15). Un diagnostic différentiel fiable entre ces espèces est important puisque seule l'infestation par *E. histolytica* nécessite un traitement spécifique (1, 16, 24, 33, 34).

Nous rapportons ci-après deux cas d'amibiase asymptomatique chez un couple hétérosexuel ainsi qu'une étude des méthodes de diagnostic parasitologique utilisées.

**Observation :** Des kystes d'*E. histolytica/E. dispar*, ainsi que des kystes d'*Endolimax nanus*, furent trouvés dans les selles d'un Français de 53 ans, asymptomatique, lors d'un examen parasitologique précédant son embauche comme cuisinier à l'hôpital de Gonesse. Cet homme avait séjourné dans différents pays africains, son dernier voyage, au Cameroun, datant de 1998. Un autre échantillon de selles contenant des kystes et formes végétatives d'*E. histolytica/E. dispar* fut obtenu pour culture sur milieu de ROBINSON (21). En raison de sa profession, un traitement par métronidazole (750 mg/jour pendant 3 jours) lui fut prescrit sans attendre le résultat de l'étude biochimique de la souche d'amibes.

Les selles de sa partenaire, camerounaise de 48 ans, et de son fils de 18 ans, tous deux partageant le même appartement et tous deux asymptomatiques, furent également examinées à la recherche de kystes d'*E. histolytica/E. dispar*. Cette recherche se révéla négative pour le fils et positive pour la femme qui était également porteuse de kystes d'*E. nanus*.

**Méthodes et résultats :** Les examens sérologiques (hémagglutination indirecte et ELISA) furent négatifs. Les souches des deux porteurs furent cultivées sur milieu de ROBINSON. Les quatre enzymes déjà citées (ME, PGM, GPI, HK) furent ensuite étudiées par électrophorèse en gel d'amidon en comparaison avec deux souches de référence d'*E. histolytica* (zymodème XIX) et *E. dispar* (zymodème I). Les souches isolées des selles des deux porteurs montrèrent la présence d'une bande dense pour ME, l'absence de bandes rapides pour HK et PGM, et une bande en GPI caractéristique d'*E. dispar* zymodème I (Fig. 1, 2, 3, 4).

**Conclusion :** Ces deux cas d'infestation par *Entamoeba dispar* BRUMPT 1925, amibe non pathogène, ont donc été caractérisés par l'absence de signes cliniques et la négativité de la sérologie, comme cela est de règle avec cette espèce, et confirmés par un certain nombre de tests spécialisés, comme l'identification du zymodème I. Les deux porteurs ayant admis la pratique de rapports sexuels oraux-anaux, la présence d'*Entamoeba dispar* zymodème I et de kystes d'*Endolimax nanus* dans les 2 cas permet de suspecter très fortement une contamination à l'occasion de ce type de rapport.

*Entamoeba histolytica*  
*Entamoeba dispar*  
amibiase  
zymodème  
épidémiologie  
transmission sexuelle

the presence of a unique, dense band in ME, the species marker enzyme (Fig. 1). The protein patterns in HK and

Figures 1-4.

Thin-layer starch gels showing the isoenzyme band position for four enzymes (ME, HK, PGM and GPI) of *Entamoeba dispar* isolates from the man (zymodeme I, lane 6) and his female partner (zymodeme I, lane 7), the reference strains of *E. dispar* zymodeme I (lane 4), and *E. histolytica* zymodeme XIX (lane 5).

The higher band for GPI is due to the accompanying bacterial flora. In the lanes 1,2,3,8 runs of other 4 patients are showed: lane 1, *E. histolytica*, zym XIX; lane 2 *Entamoeba coli*; lane 3, *E. dispar* zymodeme IX; lane 8: *Iodamoeba bütschlii*.

Fines couches de gels d'amidon indiquant la position de la bande de précipité pour quatre enzymes (ME, HK, PGM et GPI) d'isolats d'*Entamoeba dispar* prélevés chez l'homme (zymodème I, colonne 6) ainsi que chez sa partenaire féminine (zymodème I, colonne 7), les souches de référence d'*E. dispar* zymodème I (colonne 4), et *E. histolytica* zymodème XIX (colonne 5).

La bande supérieure pour le GPI s'explique du fait de la flore bactériologique. Dans les colonnes 1, 2, 3, 8, les cours des 4 autres patients sont indiqués: colonne 1, *E. histolytica*, zym. XIX; colonne 2 *Entamoeba coli*; colonne 3, *E. dispar* zymodème IX; colonne 8: *Iodamoeba bütschlii*.

Fig.1 - ME

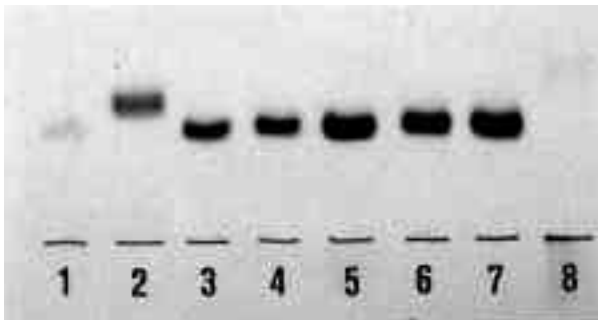


Fig.2 - HK



Fig. 3 - PGM

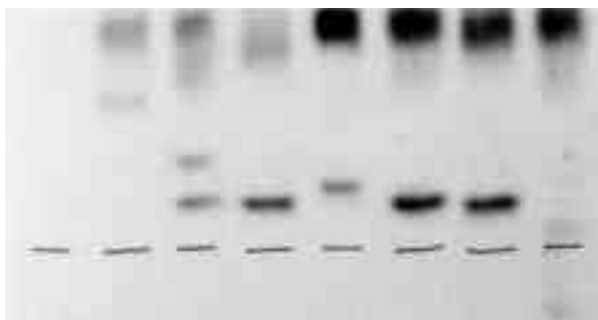
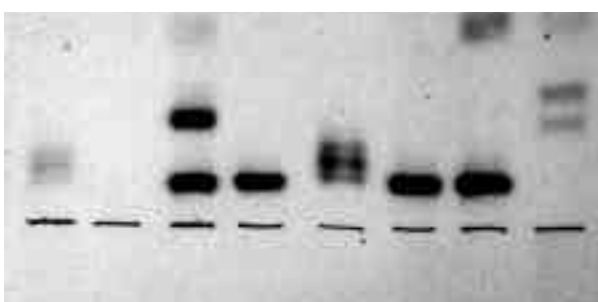


Fig.4 - GPI



PGM allowed the classification of both isolates in the non-pathogenic *E. dispar* species, because of the lack of "fast" bands, clearly visible in the run of the reference zymodeme XIX of *E. histolytica* (Fig. 2-3). The position of the protein bands in GPI (Fig. 4) confirmed that both strains belonged to *E. dispar* zymodeme I.

Fresh stool samples of the subjects were also investigated by two kits for the stool antigen detection, one specific for pathogenic *E. histolytica* (*E. histolytica* II<sup>®</sup>, TechLab, Blacksburg, VA, USA) and the other cross-reacting with non-pathogenic *E. dispar* (ProSpecT<sup>®</sup> *Entamoeba histolytica* Microplate Assay, Alexon-Trend, Ramsey, MN, USA). Regarding the direct faecal antigen identification performed with the Alexon and TechLab assays, the data obtained agreed with the biochemical typisation, because the former was positive (inability to separate *E. histolytica* from *E. dispar*) and the latter gave negative results (specificity only for *E. histolytica*).

The cases were also investigated by serology, using an indirect haemagglutination assay (Celloagnost<sup>®</sup> Amoebiasis, Behring, Marburg, Germany) and an immunoenzymatic technique (Amoebiasis Serology Microwell ELISA<sup>®</sup>, LMD Laboratories, Ramsey, MN, USA). The tests gave negative results for both subjects.

## Discussion

*E. histolytica* infection represents a public health problem in many tropical and subtropical zones, especially in developing countries. However, in highly developed countries, amoebic infection is uncommon and occurs primarily in high risk groups, such as travellers to endemic areas (2, 32), immigrants living outside the community (19), as well as people institutionalised in psychiatric centres (7, 8, 13, 27) and male homosexuals (4, 31, 32).

To date, there is biochemical, immunological and genetic evidence indicating that *E. histolytica* is a complex of two species: *E. histolytica* "sensu stricto", pathogenic species with varying degrees of virulence, and *E. dispar* non-pathogenic, saprophytic one (1, 3, 16, 17, 25, 28).

The results obtained by isoenzyme analysis showed that both the amoebic isolates from the man and the woman belonged to *E. dispar*, zymodeme I and agreed with those of the two kits for the detection of galactose-inhibitable lectin antigen in fecal samples by ELISA, especially the TechLab<sup>®</sup> assay which uses epitope-specific monoclonal antibodies to differentiate between *E. histolytica* and *E. dispar* infection.

It is well known that the classical route of transmission of amoebic infections is the indirect faecal-oral one, but sexual practices present an alternative route, as seems likely for the couple under study, who partook in anal and oral-anal intercourse. The presence of *E. nanus* in the two partners seems also to favour the hypothesis of contamination during sexual intercourse.

Microepidemics of symptomatic and asymptomatic amoebiasis were described in family groups and closely associated individuals and this fact highlights the importance of alternative direct person-to-person transmission (5, 11, 29).

The lack of any sign or symptom in the subjects we examined confirms once more that amoebic stocks characterised by some peculiar isoenzyme patterns constitute a well defined non-pathogenic species *E. dispar*, even if numerous individuals are only carriers of *E. histolytica*. The data we obtained in both subjects were corroborated by the negativity of the serologic tests and of specific *E. histolytica* coproantigen searched by enzyme immunoassay (18).