UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

"Detección de antígeno adhesina de *Entamoeba histolytica* en muestras de heces de pacientes positivos por *Entamoeba histolytica /Entamoeba dispar"*

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA

GEOVANNY ZELEDÓN ZAMORA

SEDE RODRIGO FACIO
JULIO 2004

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el primero de julio del año 2004, con el objeto de recibir el informe oral del estudiante GEOVANNI ZELEDÓN ZAMORA, carné 994460, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Mario Chaves Villalobos PRESIDENTE
Dr. Alfredo Castro Castillo
Dra. Elizabeth Abrahams Sandí
Dra. Olga Guerrero Bermúdez
Dra. Gabriela Solano Trejos

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de GEOVANNI ZELEDÓN ZAMORA, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante GEOVANNI ZELEDON ZAMORA, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "DETECCION DE ANTÍGENO ADHESINA DE *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* EN MUESTRAS DE HECES DE PACIENTES POSITIVOS POR ENTAMOEBA *HYSTOLYTICA/ENTAMOEBE* DISPAR"

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: OCHO

ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 15:27 horas.

Dr. Mario Chaves Villalobos
Presidente

Dr. Alfredo Castro Castillo

Dra. Elizabeth Abrahams Sandí

Dra. Olga Guerrero Bermúdez

Dra. Gabriela Solano Trejos

Geovanni Zeledón Zamora
Postulante

Dedicatoria

Por los momentos felices que me han brindado, por que siempre han estado a mi lado, me han visto en los momentos más críticos de mi vida de dolor y llanto, pero siempre sobre todas las cosas me han apoyado y han confiado en mí, por esto regalo como agradecimiento, estas páginas de felicidad a las dos personas que me regalaron el tesoro de la vida y sus consejos más fieles,

A mi padre y madre.

Agradecimientos

Por los momentos de lucha que me regalaron, los consejos, por ser ángeles que un ser supremo me regalo, por la fuerza que día a día me brindaron, por estar siempre en el momento indicado, por esos regaños que necesitaba para no caer en el abismo de la desesperación agradezco a:

Dra. Elizabeth Abrahams Sandí
Dra. Liliana Reyes Lizano
Cinthya Zeledón Zamora
Marjorie Zeledón Zamora
Tiffany Oporta Zeledón
Jusara Ortiz Tello
María Tello Samanez
Dennis Camareno Carrillo

INDICE

Dedicatoria i

Agradecimientos ii

Introducción 2
- Historia 2
- Ciclo de Vida 4
- Morfología 4
- Manifestaciones clínicas y complicaciones 5
- Patogénesis 7
- Epidemiología 9
- Diagnóstico 10
  - Análisis al microscopio 11
  - Cultivo y Métodos bioquímicos 12
  - Detección de anticuerpos 13
  - Detección de antígeno 14
  - Biología Molecular basada en técnicas de PCR 15
- Tratamiento 16

Justificación del Proyecto 18

Objetivos Generales y Específicos 19

Materiales y Métodos 20

Resultados 24

Discusión 26

Conclusiones 30

Referencias 31

Apéndice I 35

Apéndice II 36

Apéndice III 37

Introducción

Historia

En el año 1875 el médico ruso Fedor Lösch describió el caso de un granjero que había sido admitido en su clínica de St. Petersburgo con un cuadro de disentería crónica. Al observar las heces encontró gran cantidad de formas amiboides a las que denominó *Amoeba coli* y cuyas características morfológicas concordaron con la morfología típica de la ameba que luego se conocería como *Entamoeba histolytica* (1, 2). Lösch, sin embargo, no consideró que las amebas fueran las causantes de la diarrea. Diez años después, las investigaciones de Kartulis, Hlava, Councilman y Lafleur suministran las pruebas clínicas y anatomopatológicas necesarias para considerar a esta ameba, como el agente causal de un tipo de disentería y de absceso hepático (3, 4); en 1903 el alemán Fritz Schaudinn, da el nombre de *E. histolytica* a la ameba patógena capaz de destruir el tejido.

En el año de 1925 Emil Brumpt, parasitólogo francés, propuso que la ameba *E. histolytica* comprendía dos especies morfológicamente idénticas, una no patógena y otra patógena responsable de la amebiasis invasiva y que era posible la existencia de portadores asintomáticos de esta ameba patógena; propuso el nombre de *E. dispar* para la primera y *E. dysenteriae* para la segunda. Esto no fue ampliamente aceptado y fue rechazado por la comunidad científica internacional, principalmente por considerar que el concepto de especie representaba una idea morfológica y no debería basarse en aspectos patológicos. Así *E. dispar* no fue reconocida como especie y continuó conociéndose como *E. histolytica* durante más de medio siglo, hasta que se empezaron a acumular evidencias de que Brumpt estaba en lo cierto (4, 5).

En 1978, Sargeaunt empezó a analizar el patrón electroforético de las isoenzimas de la hexoquinasa de *E. histolytica*, estableciendo su gran valor para el estudio de la

relación hospedero-parásito. Logró determinar dos tipos de patrones electroforéticos, los cuales denominó como "zimodemas patógenos" y "zimodemas no patógenos"(4, 6).

Este investigador, en conjunto con otros de Estados Unidos, México, Europa, Israel, India, Japón y Sur África, estudiaron la distribución mundial de los zimodemas del parásito aproximadamente en 10.000 casos de amebiasis (4, 6). Todos los pacientes con amebiasis invasiva estaban infectados con amebas que presentaban zimodemas patógenos mientras que aquellos con infecciones asintomáticas, tenían zimodemas patógenos y no patógenos. Estos hallazgos condujeron a Sargeaunt a postular en 1982 que en la amebiasis estaban involucradas dos especies, una patógena y otra no patógena, y que la propuesta de Brumpt debía ser aceptada (4, 5, 7). Un grupo de investigadores de Sur África se dedicó a estudiar la relación hospedero-parásito comparando los hallazgos de zimodemas patógenos y no patógenos con los hallazgos clínicos, epidemiológicos y serológicos. En individuos con amebiasis asintomática demostraron que el 1% albergaba *E. histolytica.* Además en pacientes con amebiasis sintomática o invasiva demostraron que la respuesta serológica se asocia a los zimodemas patógenos, pero no con los no patógenos (4, 8). Estos estudios y los de Sargeaunt permitieron llegar a la conclusión de que la ameba clásicamente conocida como *E. histolytica* en realidad comprende dos especies morfológicamente idénticas: *E. histolytica* responsable de la enfermedad y *E. dispar* que es un comensal intestinal. La infección con la primera puede ser asintomática y desaparecer espontáneamente o hacerse invasiva y producir la enfermedad. Estudios genéticos recientes han demostrado una divergencia genómica entre las dos amebas, hallazgo que constituye una evidencia irrefutable de la existencia de dos especies diferenciables por métodos bioquímicos, inmunológicos y genéticos. Esta redefinición de la clásica *E. histolytica* revoluciona el conocimiento que se tenía de la relación hospedero-parásito, epidemiología y métodos óptimos de diagnóstico de esta ameba. Sin embargo, aún cuando esclarece la causa de la falta de correlación entre el número de infectados y el número de enfermos, no resuelve la incógnita de cuales son los factores que inducen a este parásito a invadir los tejidos.

En 1993 Diamond y Clark confirman la validez de *E. dispar (*Brumpt, 1925) como una especie diferente a la *E. histolytica,* (Schaudin, 1903) (2, 4) y para 1997 la

Organización Mundial de la Salud declara universalmente aceptada la existencia de esta nueva especie (2).

Ciclo de Vida

La forma infectante de *E. histolytica* es el quiste tetranucleado. Este es resistente a la acidificación y cloración, además es capaz de sobrevivir varias semanas en el medio ambiente. Éste se ingiere vía oral, ya sea por transmisión ano -mano-boca, alimentos contaminados o agua mal tratada, pasa por el estómago y llega a intestino delgado. Una vez en el intestino delgado, pierde la pared quística, dando paso a un citoplasma con cuatro núcleos, que se divide, separa y forma ocho trofozoitos que se conocen con el nombre de amebas metaquísticas (9, 10).

Los trofozoitos continúan su viaje y llegan al intestino grueso donde van a colonizar, esto es a multiplicarse por fisión binaria. La mayoría de los trofozoitos en la luz intestinal son comensales o bien luminales (antes llamados forma minuta), algunos de ellos de manera obligatoria van a atravesar la mucosa intestinal de intestino grueso y transformarse en la forma invasiva. Esta mide de 20- 30 μm y en ella se pueden observar glóbulos rojos en el citoplasma, a estos trofozoitos se les llama patógenos o tisulares (antes llamados forma magna).

El trofozoito tisular no puede pasar de nuevo a la forma luminal para salir por las heces, esto no quiere decir que no pueda ser detectado en una muestra clínica, pues se puede dar el caso de que al desprenderse la mucosa intestinal arrastre al trofozoito (9).

E. histolytica produce los quistes en su forma luminal y estos son los encargados de dar continuidad al ciclo. *E. dispar* tiene un ciclo que es idéntico al anterior, con al diferencia de que nunca hay penetración a la mucosa intestinal y por consiguiente no hay patología.

Morfología

E. histolytica puede presentar dos formas de trofozoito uno tisular y otro comensal, así como una forma de resistencia que se conoce como.

El trofozoito comensal presenta un tamaño de 15 a 20 μm y el tisular de 20 – 30 μm. Además puede presentar inclusiones como glóbulos rojos y bacterias. Su movimiento es progresivo, mediante la formación de un pseudópodo único (lobópodo) en el cual fluye el protoplasma (9, 11). Los glóbulos rojos se tiñen cuando están presentes.

El núcleo presenta una membrana nuclear fina, la cromatina forma una capa de granos finos adosados a la pared interna y el cariosoma es pequeño, puntiforme y central, excéntrico cuando hay degeneración.

El quiste maduro mide de 12 – 15 μm, es tetranucleado, pero pueden encontrarse quistes uni y binucleados. Los núcleos son de aspecto semejante a los de los trofozoitos pero de menor tamaño, tienen cariosoma y cromatina periférica. Puede haber vacuolas de glucógeno que desaparecen en la etapa final de la maduración del quiste. Los cuerpos cromatoidales, que son acúmulos de ribosomas, también pueden estar presentes, en forma de barra, con extremos romos, o ausentes (9, 11).

Manifestaciones clínicas y complicaciones

La sintomatología puede presentarse en dos formas:

Manifestaciones Intestinales

Formas Agudas:

- Formas diarréicas: lesiones agudas no tan profundas como la rectocolitis.
- Rectocolitis amebiana o clásica disentería: las lesiones se dan a nivel del recto sigmoide. Los principales síntomas son diarrea de mucho volumen, con moco y sangre, sin leucocitos puesto que la ameba ya los ha destruido, además se presenta dolor abdominal, pujo, tenesmo, astenia, adinamia y fiebre en el 2% y 5% de los casos (9, 10)
- Colitis fulminante: hay perforación a la pared intestinal. Es un cuadro grave

aunque poco frecuente. La mortalidad descrita es del 50%.

Formas Crónicas

- Colitis sin disentería: comprende dolor abdominal, cambios en el ritmo de defecación (estreñimiento o diarrea) y distensión abdominal. Se da luego de una fase o forma aguda, o simplemente como único síntoma.
- Ameboma: son lesiones viejas de *E. histolytica* en el intestino en las cuales el tejido se encapsula por medio de la fibrosis. En la parte interna de la fibrosis se observan leucocitos destruidos, amebas y fibroblastos.
- Apendicitis

Manifestaciones extraintestinales

- Peritonitis
- Fistulizaciones: se presenta cuando el parásito pasa de pared intestinal a la piel. También puede haber fístula de hígado a piel, en cuyo caso el absceso hepático drenaría afuera.
- Absceso hepático: La sangre del intestino llega al hígado a través del sistema porta, por lo que las amebas llegan al hígado por esta vía. Al quedar atrapadas en los vasos sanguíneos hepáticos van a iniciar el proceso de formación de absceso. En la periferia de éste se va a observar fibrosis y el contenido del absceso no es purulento. La sintomatología que se presenta es fiebre, dolor, malestar general, anorexia y pérdida de peso. La prevalencia del absceso hepático es de 1:400 (9, 10).

También las amebas pueden atravesar la cápsula de Glisson, que rodea el hígado, luego el diafragma y llegar a pulmón derecho. Por lo que *E. histolytica* puede llegar a pulmón derecho de dos maneras, por continuidad al atravesar el hígado y el diafragma, o por vía hematógena debido a que *E. histolytica* es reotaxis negativa, es

decir que no tiene la capacidad de reaccionar contra la corriente sanguínea, por lo que va a circular igual que la sangre.

La ameba puede pasar además a cerebro, bazo, riñón, corazón; aunque la principal localización de la amebiasis extraintestinal siempre va a ser en el hígado.

Patogénesis

Las principales manifestaciones clínicas de la infección por *E. histolytica* son la colitis amebiana y los abscesos hepáticos amebianos (12). Los trofozoitos de *E. histolytica* normalmente residen y se multiplican en el lumen del intestino grueso del hospedero. La invasión a la mucosa intestinal y otros tejidos es iniciada por factores desconocidos (13). Cuando esto ocurre, los trofozoitos se m ueven activamente a través de las capas de la mucosa, destruyendo células y diseminándose dentro de la lámina basal, vasos sanguíneos y otros tejidos. La lesión es aún mayor cuando la ameba destruye los leucocitos y estos liberan las sustancias tóxicas contenidas en sus gránulos (9, 10).

El mecanismo de patología consta de varias etapas entre las que se destacan:

A. Invasión de la mucosa intestinal por parte de los trofozoitos y aplanamiento de las vellosidades intestinales.

B. Necrosis con formación de úlceras en forma de botón de camisa al nivel de la submucosa.

C. Ulceración. La úlcera es edematosa, hiperémica y de diferentes formas; hay mucho moco y sangre debido a la destrucción del tejido por lo que la mucosa termina desprendiéndose.

D. Fibrosis. Los fibroblastos acuden a reparar la lesión (14).

E. histolytica tiene varias características que hacen que pueda producir patología. Su toxicidad es dada por una serie de componentes y sustancias producidas por la ameba, dentro de los cuales destacan la lectina de superficie, los ameboporos y

las proteasas de cisteína:

a) La lectina de superficie: la galactosa/ N- acetil galactosamina (GalNAc), es un heterodímero específico de 260 kDa, que se expresa en la superficie de los trofozoitos de *E. histolytica.* Es un factor importante de virulencia que media la unión de la ameba al epitelio intestinal y juega un papel en el contacto dependiente de citolisis. Esta lectina consiste en una subunidad pesada de 170 kDa y una subunidad liviana de 31 a 35 kDa, unidas por un puente de disulfuro (14, 15, 16). Estos receptores tienen un alto contenido de cisteína para prevenir la degradación de las proteasas intestinales.

La inhibición de la adherencia con antisuero anti- subunidad pesada, o anticuerpos monoclonales, por eliminación terminal de GalNAc de células blanco o por competición con exceso de GalNAc sugieren que la lectina es necesaria para la unión a células de mamíferos. Todos los pacientes con experiencias de enfermedades invasivas por *E. histolytica* producen una respuesta sistémica humoral contra la subunidad pesada pero no contra la subunidad liviana de lectina (17). Esto muestra que ciertos epítopos están implicados en la respuesta inmune contra la ameba. Se han utilizado epítopos para producir una vacuna (18).

También se ha visto la presencia de lectina en *E. dispar*, pero esta se presenta en menor cantidad en la superficie, con una conformación oculta. La lectina de *E. dispar* muestra adherencia disminuida, así como niveles menores en comparación con la adhesina de *E. histolytica* (9, 17). La subunidad de 170 kDa de *E. histolytica* tiene algunos epitopos diferentes a la subunidad presente en *E. dispar*, Jackson y Ravdin (19), muestran un estudio de seis anticuerpos monoclonales contra la lectina, al probar estos contra *E. dispar* encontraron que solo dos de estos seis anticuerpos reaccionaban contra ambas amebas y los otros cuatro solo reaccionaban contra *E. histolytica.*

b) Los péptidos formadores de poros, conocidos como ameboporos, son similares a los de las células NK. Son toxinas encargadas de destruir y lisar

células. La parte intermedia del péptido es hidrofóbica y las cadenas laterales hidrofílicas. Lo que les permite insertarse en la membrana de las células blanco, unirse con fosfolípidos aniónicos a bajo pH y luego polimerizar y formar moléculas de mayor peso molecular (14). Así se forman los poros por los que sale el contenido de la célula, así mismo permite la entrada de sales y agua. Estos poros se han descrito con el modelo de cascada en barril. Las funciones de los ameboporos son lisar la célula blanco y digerir las bacterias (2, 9, 14). La familia de ameboporos comprende tres isomorfos, el ameboporo A, B y C, que se encuentran en una proporción aproximadamente de 35:10:1 respectivamente (2). *E. dispar* presenta un péptido homólogo al ameboporo A y B de *E. histolytica* pero su actividad y concentración es más baja (2, 14).

c) Las proteasas de cisteína son capaces de degradar fibronectina, laminina y colágeno presentes en casi todas las células y tejidos (matriz extracelular) (9, 12, 13, 14, 20). Estas son secretadas en grandes cantidades por el parásito. Existen seis genes que codifican para las proteasas de cisteína (EhCP 1 – 6) pero aproximadamente el 90% de la actividad es debida a tres de las enzimas, EhCP1, EhCP2 y EhCP5 (12). En *E. dispar* estas proteasas se han encontrado en menor concentración lo cual se ha relacionado a su falta de virulencia (2).

d) Lisozima amebiana donde el blanco fundamental son las bacterias Gram positivas, además la Fosfatasa Ácida (A_2) es capaz de hidrolizar fosfolípidos como los de la membrana celular (14).

Epidemiología

E. histolytica es el agente etiológico de la amebiasis, una enfermedad común en el mundo. Para el año de 1981, se reporta una prevalencia a nivel mundial de cerca de 500 millones de personas infectadas con este parásito (19). Sin embargo, este dato no tomó en cuenta la diferencia entre *E. histolytica* y *E. dispar*, pues el diagnóstico en la mayoría de los casos se realizó únicamente por la observación microscópica de qui stes y

trofozoitos al fresco o por tinción. Actualmente se estima que *E. histolytica* es la responsable de sólo el 10% de las infecciones reportadas, mientras que *E. dispar* lo es del resto (19).

Se calcula que *E. histolytica* causa de 50 a 100 millones de casos de colitis - invasiva y/o abscesos hepáticos, con una mortalidad de aproximadamente 100000 personas por año (21).

En Costa Rica, en 1987, se informó de una prevalencia del 16% para *E. histolytica /E. dispar* en niños de guarderías del Cantón Central de San José (2). Además otro estudio realizado por Morales y colaboradores (22), encuentra una prevalencia del 2.9% en el año de 1989 y del 1.08% en 1994, en la comunidad de Torremolinos de Desamparados. En la provincia de Limón se ha demostrado una prevalencia por *E. histolytica /E. dispar* del 7.5% (23)

En relación con la prevalencia de anticuerpos específicos contra *E. histolytica*, León y Reyes (2), realizaron un estudio utilizando el suero de 41 pacientes, positivos por quistes de *E. histolytica /E. dispar* en heces, provenientes del área metropolitana de San José,. Por medio de ELISA, demostraron la presencia de anticuerpos específicos contra *E. histolytica,* en sólo 3 de las 41 muestras de suero analizadas (7.3%). Esto demostró que la mayoría de las infecciones son causadas por *E. dispar*. Los autores estimaron en promedio, que en nuestro país la prevalencia de *E. histolytica /E. dispar* es de aproximadamente 7% y de *E. histolytica* de 0.5%, lo cual parece corresponder con el bajo número de casos observados en nuestro país.

Aunque se habla de la gran morbilidad y mortalidad de *E. histolytica*, en regiones como Centroamérica y Sudamérica, África e India (10), la prevalencia real en nuestro país se desconoce, debido a la falta de estudios donde se pueda diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, motivo por el cual conocer el papel epidemiológico de esta ameba en nuestro país es muy importante.

Diagnóstico

El diagnóstico parasitológico de *E. histolytica* está basado en la demostración de quistes y trofozoitos en heces por examen directo en solución salina y lugol, o tinción

de hematoxilina férrica de Heidenhain. La observación directa no permite diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar,* por esta razón en los últimos años se han realizado esfuerzos por desarrollar nuevos métodos inmunológicos que faciliten la detección. Algunos de estos métodos permiten detectar antígenos específicos de *E. histolytica* en las heces, o anticuerpos específicos en sangre contra *E. histolytica*.

Durante las últimas décadas han sido desarrollados procedimientos diagnósticos basados en biología molecular para detectar *E. histolytica,* hasta el punto en que hoy día son preferidos para estudios de investigación.

El diagnóstico de pacientes con cuadro agudo de disentería es importante pero también para el 90% de infecciones asintomáticas por *E. histolytica* , porque la infección puede ser fácilmente transmitida de persona a persona, especialmente en países en vía de desarrollo con una pobre condición de higiene e inadecuado tratamiento del agua (9).

Análisis al microscopio

El diagnóstico de *E. histolytica* ha sido históricamente realizado por examen de la morfología del protozoario. La especificidad y sensibilidad de la microscopia convencional en una muestra de heces, para diferenciar entre especies de *Entamoeba* ha sido demostrada en muchos estudios como inadecuada. Un camino para distinguir entre *E. histolytica* de *E. dispar* es la eritrofagocitosis, la cual es una técnica pobre. Esto se debe a que esta ingesta de eritrocitos no es frecuente en infecciones amebianas crónicas. Además también se habla que en algunos casos *E. dispar* puede fagocitar eritrocitos.

En montajes de muestras con solución salina, los núcleos no se observan claramente, en la preparación se puede observar cristales de Charcot - Leyden, producto de la degradación de eosinófilos. Cuando se observan trofozoitos, la movilidad observada es lineal, unipodal. En los quistes se pueden observar cuerpos cromatoidales (cúmulos de ribosomas) y corpúsculos de glucógeno cuando son inmaduros(9, 10).

Las muestras pueden ser observadas sin teñir o teñidas con solución de Lugol o solución de yodo de D' Antoni. Se pueden realizar otras tinciones como Giemsa, azul de metileno, Wright y tinción tricrómica de yodo, así como hematoxilina férrica modificada.

La tinción presentan varios inconvenientes como inadecuada recolección de la muestra, interferencia de sustancias como antibióticos, laxantes, antiácidos, catárticos, preparaciones antidiarréicas, bajo número de especimenes, falta de preservación, experiencia del microscopista.

Así el diagnóstico por montaje directo requiere de una buena habilidad visual y experiencia, sino se puede guiar a un diagnóstico inadecuado.

Cultivo y Métodos bioquímicos

Los primeros en cultivar *E. histolytica,* fueron Boeck y Drbohlav, quienes utilizaron un medio bifásico inclinado a base de huevo (11, 24). Hoy en día encontramos medios como el de Locke, el medio de Robinson y TYSGM-9 de Diamond, estos dos últimos son más frecuentemente usados para cultivos xénicos de *E. histolytica*. Después se empezaron a usar exitosamente cultivos como TYI-S-33, y el medio Dobell (9).

El mantenimiento de estos protozoarios en cultivos no es fácil y requiere de una intensa labor. Además se debe recordar que cuando un cultivo es negativo necesariamente, no indica que *E. histolytica* no esté presente.

Luego de obtener los trofozoitos en el cultivo se procede a realizar análisis isoenzimáticos, para obtener zimodemas y diferenciar especies. La desventaja de estos es que no son capaces de excluir especies cuando hay un sobrecrecimento de una especie (*E. dispar)*, en cultivos con coexistencia de otra especie.

Un total de 24 zimodemas diferentes, compuestos por 21 zimodemas de aislamientos humanos (9 correspondientes a *E. histolytica* y 12 a *E. dispar*) y 3 de cepas de cultivos amebianos experimentales, han sido reconocidos. Estos zimodemas se diferencian a través de separaciones electroforéticas de enzima málica, hexokinasa, glucosa fosfato isomerasa, e isoenzimas de fosfoglucomutasa. Estos permiten diferenciar entre la dos especies(4, 9).

La técnica presenta algunas desventajas como la dificultad de ejecutar el test, y el tiempo que consume. El uso de métodos bioquímicos en regiones endémicas puede guiar a un mejor entendimiento de la condición epidemiológica.

Detección de anticuerpos

Personas de áreas endémicas han estado expuestas a la infección amebiana por mucho tiempo, lo que genera una respuesta de anticuerpos. Los síntomas atribuidos comúnmente a *E. histolytica* pueden estar ausentes en la mayoría de los casos. Anticuerpos en suero contra *E. histolytica* pueden ser detectados en un 75 a un 85% de los pacientes con sintomatología. Estos pueden ser detectados en hemaglutinación indirecta, test de difusión en gel, complejos de fijación, ensayos de inmunofluorescencia, aglutinación en latex y ELISA (9, 10).

El ELISA es uno de los ensayos más utilizados en el mundo. La técnica puede ser utilizada para propósitos clínicos (particularmente para el diagnóstico de absceso hepático), entonces el valor de la especificidad para detectar anticuerpos en pacientes asintomáticos es alto. La sensibilidad en la detección de anticuerpos específicos contra *E. histolytica*, en suero, es cerca del 100%, lo cual es muy prometedor en el diagnóstico del absceso hepático amebiano.

Inmunoglobulinas anti – lectina tipo G (IgG) se pueden encontrar una semana después de iniciados los síntomas de pacientes con colitis amebiana y absceso hepático, con un valor superior del 95%.

La mayor dificultad que presenta este método es que no puede diferenciar si la respuesta es debida a una infección reciente, o a la inmunidad adquirida por un contacto con la ameba ocurrido en el pasado.

Es importante notar que la presencia de IgA anti – lectina en la mucosa es asociada con protección inmune contra la colonización por *E. histolytica.* El diagnóstico de laboratorio es basado en la presencia de IgG anti – lectina o por la existencia de anticuerpos IgM contra *E. histolytica.* Algunos estudios muestran que la sensibilidad para la primera semana de infección, es de 45.1% en el caso de IgM anti – lectina y para la IgG anti – lectina de 5.6%. Los valores se incrementan para períodos más largos de una semana en 79.3% para la IgM y 93.1% para la IgG. Aunque también se informa que pacientes con *E. dispar* pueden algunas veces presentar altos títulos de anticuerpos anti – amebianos (9).

Detección de antígeno

La detección de antígeno por medio de la técnica de ELISA tiene varias ventajas significativas sobre otros métodos utilizados para el diagnóstico de la amebiasis. Algunos de los ensayos diferencian entre *E. histolytica* y *E. dispar,* tienen una excelente especificidad y sensibilidad, son útiles para laboratorios no experimentales, y utilizan un plato de 96 hoyos, lo que los hace efectivos para estudios epidemiológicos (9) .

En el mercado encontramos ensayos como el panel parasítico Triage (BIOSITE Diagnostic. San Diego California), que es una tira inmunocromatográfica con anticuerpos monoclonales específicos contra antígeno de *E. histolytica /E. dispar,* antígenos de *Lamblia intestinalis,* y *Cryptosporidium parvum.* Este presenta una especificidad del 99.1% y una sensibilidad de 96%, para *E. histolytica /E. dispar*, comparada con el examen directo en solución salina (9).

Otro método es el Alexon ProSpect ELISA el cual muestra una sensibilidad del 73.5% y una especificidad del 97.7%. sin embargo estos dos test presentan la desventaja que no pueden distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* (9).

En la actualidad encontramos kits que son específicos para la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* utilizando anticuerpos monoclonales (TechLab *E. histolytica* II) o anticuerpos monoclonales contra una serina (Optimun S kit; Merlín Diagnostika). Además de estos ensayos existen investigaciones de otros ensayos contra antígenos como lisina de superficie, un lipofosfoglican, y un antígeno no caracterizado (9, 21, 30).

Se ha desarrollado una prueba de inmunofluorescencia que utiliza anticuerpos monoclonales que reconocen una subunidad recombinante de 170 KDa de la lectina Gal o GalNAc de *E. histolytica* que reconoce a ésta, pero no la de *E. dispar,* en muestras de heces preservadas (9, 16).

El TechLab *Entamoeba* test y el TechLab *E. histolytica* II test están basados en la detección de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica*. Varios estudios encuentran una sensibilidad de 80 a 90 % y especificidad de 86 a 98 % para ambos test. Otras muestras diferente de heces que pueden ser usadas para estos kits son saliva, suero, y fluido de

abscesos (9, 21)

El TechLab *E. histolytica* II (21), es un ELISA específico para la lectina Gal/GalNAc. En esta prueba, la microplaca está recubierta con anticuerpos policlonales inmovilizados, que unen adhesina de *E. histolytica/ E. dispar.* El conjugado es un anticuerpo monoclonal unido a la peroxidasa, específico para la adhesina de *E. histolytica.* La detección se hace por el desarrollo de color (30).

En resumen, la detección de antígenos en las heces en algunos casos ofrece un práctico, sensible, y específico método para el diagnóstico clínico de la amebiasis. Aunque presentan la desventaja que los antígenos detectados son desnaturalizados por fijación, limitando el test a muestras frescas o congeladas.

Biología Molecular basada en técnicas de PCR

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece ventajas sobre otras técnicas como lo son la alta sensibilidad y especificidad que presenta. Entre sus desventajas están que es una técnica que toma largos períodos de tiempo, es compleja y de costos elevados. Además el PCR es susceptible a la contaminación cruzada y podría dar resultados falsos negativos debido a la inhibición de la ADN polimerasa en muestras de heces(9).

Sin embargo esta técnica puede llegar a convertirse en el estándar de oro. Muchos investigadores han reportado el uso exitoso del PCR para el diagnóstico de la amebiasis. Los métodos de extracción de ADN de las muestras de heces, y el uso de cebadores específicos (primers) son la llave para un adecuado diagnóstico.

También se pueden realizar análisis de polimorfismo mediante técnicas de amplificación de segmentos mediante el uso de enzimas de restricción, lo que permite diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar.* Además el análisis de PCR permite identificar procesos de coexistencia de ambas amebas mediante la amplificación y uso de marcadores diferentes para dichas especies(9, 10).

Diagnóstico de absceso hepático amebiano

Se utilizan métodos como el ultrasonido, la tomografía axial computarizada (TAC) o punción hepática (muy peligrosa), pero son poco específicas.

Tratamiento

El tratamiento para la amebiasis intestinal, más frecuente en la infancia, tiene, aspectos importantes, el primero de ellos, a quién tratar?, y el segundo, cómo tratarles?

En primer lugar se da tratamiento médico a los enfermos de amebiasis intestinal aguda, enfermedad diarreica aguda y disentérica (10% del total de cuadros de gastroenteritis o enfermedad diarreica aguda). El tratamiento se prescribe con base en el diagnóstico y el criterio clínico del médico tratante.(25)

Los casos de amebiasis extraintestinal, siempre requerirán de tratamiento médico y/o quirúrgico.

En segundo lugar se considera que por salud pública es recomendable dar tratamiento médico a los convalescientes de enfermedad amebiana aguda, que se sabe son importante factor de excreción de quistes infectantes de *E. histolytica*.

En tercer lugar deben tratarse los portadores sanos que se compruebe excretan quistes de *E. histolytica* o los adultos con enfermedad amebiana crónica.

El tratamiento de amebiasis intestinal es fundamentalmente farmacológico, a base de medicamentos que pueden subdividirse en tres grandes grupos:

a) Los que actúan en el lumen intestinal, como las quinoleínas, la diloxanida, el sulfato de paromicina y las quinfamidas.

b) Los amebicidas tisulares, como la emetina, dehidroemetina y la cloroquina.

c) Derivados imidazólicos que actúan en ambos niveles, donde se encuentra el metronidazol, o el secnidazol; pero estos productos se acompañan de efectos

adversos, los que son mayores con aquellos derivados que se aplican por menos tiempo (26).

La respuesta al tratamiento farmacológico es adecuada en más del 90 % de los casos a dosis terapéuticas. El tratamiento más eficaz en el cuadro agudo (síndrome disentérico, colitis aguda) sigue siendo el metronidazol (en niños la dosis es de 35-50 mg/kg/d por 10 días) solo o asociado con dehidroemetina (l mg/kg/d/por 10 días) (25).

Asimismo, es afortunado que después de su uso por varios decenios, no haya aparecido una franca resistencia de la *E. histolytica* al metronidazol ni a las quinoleínas.

Aunque la emetina continua salvando vidas en situaciones apropiadas, esta droga tiene serios efectos secundarios (27, 28). La droga es lentamente excretada por intestino y orina, lo que permite el aumento de la concentración en el hígado, corazón, y otras vísceras. Si es administrada vía oral puede causar vómito, y se absorbe muy poco.

La quinfamida, derivado del dicloro-acetilquinolinol, es activo sobre los trofozoítos de *E. histolytica*, localizados en la luz y pared intestinal. Por eso resulta un fármaco adecuado no solamente para el tratamiento de la colitis amebiana, sino también para tratar al sujeto «portador sano» que se constituye primordialmente como la principal fuente de emisión de quistes. Se utiliza exclusivamente por la vía oral y se presenta en tabletas de 100mg y en suspención con 50mg por cada 5ml. En ambos casos se administra por un solo día, a la dosis de 300mg en adultos y, en los niños a razón de 4, 3 mg/kilo/ día (26).

La ingesta de esteroides, provoca en *E. histolytica,* un aumento en su virulencia, lo cual constituye aumento de daño (29).

Justificación del Proyecto

Como ya se mencionó anteriormente, existen dos especies morfológicamente iguales, *E. histolytica* y *E. dispar.* De dichas especies solo *E. histolytica* es capaz de producir patología, mientras que *E. dispar,* se comporta como una ameba comensal.

Hasta el momento, no se aplica en ningún laboratorio clínico del país una prueba que detecte específicamente a *E. histolytica.* La distinción entre estas especies permitiría tener diagnósticos más acertados y confiables, y así evitar tratamientos innecesarios, que además de costosos producen algunos efectos secundarios. A su vez, la identificación de la especie contribuiría a determinar la proporción real en que se encuentra *E. histolytica* respecto a *E. dispar.* Lo anterior permitiría orientar mejor los esfuerzos dirigidos a la eliminación del patógeno y aportaría datos importantes a la investigación sobre dicha especie, un parásito de importancia médica a nivel mundial.

La falta de estudios específicos en Costa Rica, de la incidencia de *E. histolytica* hace que no se conozca su importancia como parásito, distribución, así como cuales son los grupos de mayor riesgo, tanto a nivel etario como socioeconómico.

En este trabajo se utilizó una prueba de ELISA para la detección de adhesina específica de *E. histolytica,* en muestras de heces positivas por quistes de *E. histolytica /E. dispar* provenientes de diferentes clínicas de la provincia de San José.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General

- Detectar la presencia del antígeno adhesina de *E. histolytica,* obtenidos del cultivo de muestras de heces diagnosticadas por microscopía con *E. histolytica /E. dispar.*

Objetivos Específicos

- Confirmar la morfología *E. histolytica /E. dispar,* observada al fresco, mediante la tinción de hematoxilina férrica.

- Cultivar las muestras positivas por *E. histolytica /E. dispar,* para obtener trofozoitos de dicha ameba.

- Aplicar el kit TechLab *Entamoeba histolytica* II, para diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar,* y determinar la proporción en que se encuentran ambas amebas.

- Evaluar la utilidad de este método para su posterior implementación en clínicas de salud.

Materiales y Métodos

Materiales

- Muestras Clínicas

Heces, provenientes de diferentes clínicas de San José, y diagnosticadas por *E. histolytica /E. dispar*, en la sección de Protozoología Médica.

- Kit para la detección del antígeno adhesina de *E. histolytica*

Blacksburg, Estados Unidos TECHLAB® 2002

ELISA *Entamoeba histolytica* II (30).

Metodología

Análisis de las muestras Clínicas

Se utilizan muestras de heces provenientes de diferentes clínicas de San José, diagnosticados en la sección de Parasitología Médica como *E. histolytica /E. dispar*. Este diagnóstico se realiza al observar la morfología de los quistes o trofozoitos en solución salina o lugol.

Tinción

Se realiza una tinción de hematoxilina Férrica de Heidenhain (ver apéndice I) (11), a las muestras de heces positivas por *E. histolytica /E. dispar,* que tengan una cantidad suficiente de heces, para ello se refrigeran las muestras hasta tener 10 muestras, a las cuales se les realiza la tinción.

Cultivo de las Muestras

Se cultivan las muestras en Medio Dobell y Laidlaw modificado (ver apéndice II) (11), luego se toma una pequeña cantidad de la muestra, se introduce en el tubo con la fase sólida y líquida, luego se añade 2 gotas de una mezcla de Penicilina 100 UI y Estreptomicina 100 mg/mL y 2 mg de almidón. Se incuban los cultivos a 37° C, se revisan cada 48 horas, para verificar la presencia de trofozoitos de *E. histolytica /E. dispar.* Si los cultivos están negativos se realiza un segundo pase.

Los cultivos positivos por trofozoitos de *E. histolytica /E. dispar,* se mezclan con ayuda de un vortex por 10 segundos, se toma una alí cuota de 2 a 3 ml, se congela a −70 °C, hasta reunir un número adecuado de muestras para realizar el ELISA.

Determinación de la presencia de adhesina

Se determina la presencia del antígeno adhesina de *E. histolytica* por medio del kit TechLab *E. histolytica* II.

Se prepara una dilución 1/2 de cada cultivo positivo por trofozoitos de *E. histolytica/E. dispar*, de la siguiente manera:

Las alícuotas de cultivo se descongelan a temperatura ambiente, se mezclan en el vortex por 10 segundos para homogenizar la cantidad de trofozoitos y adhesina en la muestra y se prepara una dilución 1/2 con el diluente (400 µL del cultivo y 400 µL del diluente), se mezcla en un vortex por 10 segundos.

Se utiliza dos pozos control en la microplaca, al pozo control positivo se le agrega 1 gota del reactivo control positivo el cual contiene adhesina purificada de *E. histolytica* en una solución buffer con 0.02% de timerosol, al pozo control negativo se le agrega 100 µL de diluente. Se transfiere 200 µL de las muestras diluidas a cada pozo.

Luego se agrega 1 gota de conjugado al pozo control positivo, al control negativo y a cada pozo de las muestras a evaluar y se incuba por 2 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el período de incubación, se descarta el contenido de los pocillos,

se agrega a cada pozo solución de lavado y se descarta, se invierte la microplaca en papel secante y se golpea contra éste para eliminar el exceso, se repite este lavado 4 veces usando el papel secante cada vez para eliminar el exceso de solución de lavado.

Después de lavar y remover completamente cualquier residuo visible, se vuelca la microplaca sobre el papel secante y se escurre unos 10 segundos.

Seguidamente se agrega 2 gotas de sustrato, el cual presenta una coloración azul, a cada pozo. Se mezcla suavemente al inicio, se incuba a temperatura ambiente, transcurridos 5 minutos se vuelve a mezclar suavemente para homogenizar el sustrato y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos más, en total el período de incubación es de 10 min.

Se agrega una gota de solución "Stop" a cada pozo, se mezcla, se deja transcurrir un período de 2 min, la solución "Stop" convierte el color azul a un color amarillo el cual se cuantifica por medición de la densidad óptica en una lector dual de ELISA de 450 nm y 620 nm. Se debe leer en un período máximo de 10 minutos, después de 10 minutos los valores no son confiables (30).

Interpretación de los resultados

Interpretación visual

El kit TechLab *E. histolytica* II avala una interpretación visual del ELISA (30), para ello se procede de la siguiete forma: el control negativo debe ser incoloro o presentar una mínima coloración amarilla. El control positivo debe verse claramente amarillo. En la prueba es considerada positiva cuando el color amarillo es mayor al del control negativo. La muestra puede ser menos o más amarilla que el color observado en el control positivo. Una muestra se considera negativa si la reacción es incolora o menos amarillo que el control negativo.

Interpretación espectrofotométrica

Se obtiene la absorbancia del control negativo, la cual debe presentar un valor de

0.150 o menos. Si el valor es mayor a 0.150, el test se invalida y debe ser repetido.

Luego se sustrae el valor del control negativo a el valor del control positivo, y al valor de cada muestra. La lectura para el control positivo debe de ser igual o mayor a 0.500 después de sustraer el valor del control negativo. Si el valor es menor, el test debe ser repetido.

Una muestra se considera positiva por la presencia de adhesina si el valor es mayor de 0.050 después de sustraer el valor del control negativo. Una muestra se considera negativa por la presencia de adhesina si el valor es menor de 0.050.

Un resultado positivo indica que la adhesina de *E. histolytica* está presente, un resultado negativo indica que la presencia de la adhesina de *E. histolytica* no está presente en la muestra.

Sensibilidad Analítica

El *E. histolytica* II detecta aproximadamente 0.2 a 0.4 ng de adhesina de *E. histolytica* por pozo (30).

Resultados

Se escogen 135 muestras positivas por quistes de *E. histolytica /E. dispar.* Éstas muestras positivas por *E. histolytica* se sembraron, en medio Dobell y Laidlaw modificado, en donde solo 44 (32.6%) desarrollaron trofozoitos a 37 °C.

Se realizó la tinción hematoxilina férrica de Heidenhain (11) solamente a 37 de las 44 muestras, debido a que 7 muestras restantes present aban una cantidad insuficiente de material fecal. Todas las 37 muestras presentaban una morfología de los quistes que correlaciona con *E. histolytica /E. dispar,* lo cual concuerda con lo observado al fresco.

Las primeras 14 muestras de los cultivos no se congelaron, la metodología se varió a partir de la muestra 15, porque el cultivo es deficiente para mantener la viabilidad de los trofozoitos por más de 48 horas. Entonces se decide congelar a -70 °C el resto de los cultivos.

Se determinó la presencia de adhesina mediante el ELISA TechLab *E. histolytica* II, en los 44 cultivos positivos por *E. histolytica /E. dispar*. Las muestras 07, 14, 30, y 32 (Ver cuadro I del apéndice III), resultan positivas por la presencia de antígeno adhesina de *E. histolytica* (9.9 %). El resto no presentan adhesina de *E. histolytica* (90.1%).

Así se pueden obtener los siguientes datos:

Cuadro I Resultados obtenidos mediante la aplicación del kit TechLab *Entamoeba histolytica* II

Muestras Cultivadas (Medio Dobell y Laidlaw)	Cultivos positivos	Muestras Positivas por adhesina de *E. histolytica*	Muestras negativas por *E. histolytica*
135	44 (32.6%)	4 (9.9)	40 (90.1%)

Además se congeló el control positivo por un período de dos meses, para observar si la adhesina pierde estabilidad, los resultados fueron los siguientes:

Cuadro II Control positivo congelado después de un período de un mes y seis días, para evaluar positividad

Muestra	Densidad Optica
CN	0.000
CP	2.428
CP congelado	2.896

Cuadro III Control positivo congelado después de dos meses, para evaluar positividad.

Muestra	Densidad Optica
CN	0.000
CP	2.276
CP congelado	2.438

El control positivo congelado se trató de la misma forma que una muestra, esto pudo ser lo que produjo diferencias en las absorbancias.

Discusión

La amebiasis es la infección del tracto gastrointestinal en el ser humano, por un protozoario que es capaz de invadir la mucosa intestinal y que puede migrar a otros órganos, principalmente el hígado (14). El agente etiológico de la amebiasis es *Entamoeba histolytica.*

Con el uso de métodos bioquímicos, genéticos e inmunológicos, la especie *E. histolytica* fue redefinida en 1993, y se reconoció la existencia de dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas: *E. histolytica* agente patógeno y *E. dispar* un organismo comensal (10). Para 1997 la organización mundial de la salud declara universalmente aceptada la existencia de esta nueva especie (2, 4). A partir de este momento se pone de manifiesto la importancia de utilizar técnicas más sensibles y específicas en el laboratorio clínico, que sean capaces de distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar.*

Para determinar la presencia de *E histolytica /E. dispar*, se analizaron, en el presente estudio, muestras de heces provenientes de diferentes clínicas de San José. Mediante la observación en solución salina y lugol, se obtuvo un total de 135 muestras positivas en un período aproximado de un año. Esto demuestra la frecuencia con que puede ser diagnosticada en nuestros laboratorios la *E. histolytica /E. dispar* y reafirma la importancia de poder distinguir entre ambas especies.

Los únicos estadios evolutivos observados en las 135 muestras fueron los quistes de la ameba. Para confirmar el diagnóstico hecho al fresco de *E. histolytica /E. dispar,* se realiza a las muestras la tinción de hematoxilina férrica de Heidenhain a todas las muestras. Esta técnica nos permite observar mejor las características presentes en los quistes o trofozoitos, aunque también presenta el inconveniente de no poder diferenciar entre ambas amebas.

Si bien la evaluación de las muestras de heces por montaje al fresco con solución salina y lugol es de gran importancia para orientar sobre la presencia de organismos comensales y/o patógenos, no es el método adecuado para diferenciar entre *E.*

histolytica y *E. dispar*. Después de este análisis se puede utilizar exámenes confirmatorios o más certeros. Hay que recordar la importancia clínica y las implicaciones epidemiológicas al aceptarse *E. histolytica* como una especie diferente a *E. dispar* (14).

Luego de identificar y separar las muestras positivas por *E histolytica /E. dispar*, se procedió a utilizar el kit TechLab *E. histolytica* II, un inmunoensayo enzimático para la detección de lectina adhesina de *E. histolytica* en muestras de heces humanas (30). El kit utiliza anticuerpos que reconocen epitopos específicos de *E. histolytica,* localizados en la subunidad de 170 kDa de la adhesina presentes en el trofozoito. El kit es capaz de detectar niveles tan bajos de adhesina de 0.2 a 0.4 ng. Como en la mayoría de las muestras positivas lo único que se observó fueron quistes de *E histolytica /E. dispar*, se hizo necesario hacer un cultivo previo de las muestras.

Al cultivar las 135 muestras sólo se logra desarrollar trofozoitos en 4 4 muestras, lo que corresponde a un 32,6%. La baja eficiencia obtenida en los cultivos podría deberse a varias razones: el medio utilizado Dobell y Laidlaw, es un medio tipo xénico, en el cual el parásito crece en presencia de una flora bacteriana indefini da (24), la que si crece a muy altos niveles, compite con *E. histolytica /E. dispar* por los nutrientes del medio (24); la madurez y cantidad de los quistes presentes en la muestra, así como la sensibilidad de los trofozoitos a diferentes temperaturas. Otras desventajas del cultivo son el tiempo, material y personal experimentado que requiere.

Los cultivos que desarrollaron trofozoitos se congelaron en alícuotas 3 - 4 ml a – 70° C, para su posterior utilización. El control positivo se congeló para demostrar la estabilidad de la adhesina y se evaluó durante dos meses.

En el kit TechLab *E. histolytica* II se establece que las muestras pueden ser congeladas para análisis posteriores, pero se indica que éstas no pueden sufrir períodos de congelación y descongelación más de una vez, pues la adhesina pierde estabilidad (30); además la adhesina pierde estabilidad en una muestra de heces cuando se analiza 24 horas después de emitida, debido a la degradación que sufre (30). Esto representa una desventaja en el caso de nuestro país, para el uso de este kit, pues por lo general la muestra de heces se recolecta el día anterior de su análisis y son refrigeradas lo cual no evita la degradación de la adhesina de *E. histolytica*, o bien, son analizadas 3 o 4 horas

después de ser trasladadas al laboratorio, así el período que transcurre desde la toma de la muestra hasta su análisis es variable, lo que implica posible destrucción de la adhesina. A esto hay que sumar el hecho de que la muestra puede pasar de una condición a otra (refrigeración, temperatura ambiente).

Al descongelar las muestras y realizar el ELISA, obtenemos que de las 44 muestras procesadas solo 4 son positivas por adhesina de *E. histolytica* (9.9 %). Si consideramos que los resultados negativos corresponden a *E. dispar,* la mayoría de las muestras analizadas estarían colonizadas por esta especie (90.1 %). Lo anterior concuerda con los datos suministrados por León y Reyes (2) en el año 1999 donde demuestran que la mayoría de las infecciones son causadas por *E. dispar.* Sin embargo a diferencia del presente estudio, los autores utilizaron muestras de suero para sus análisis.

Al comparar el uso del kit en este estudio con estudios en otros países encontramos que el kit TechLab *E. histolytica* II también se a utilizado en lugares como Mirpur, Bangladesh donde se compara el análisis de zimodemas con el uso del kit, utilizando muestras diarreicas de personas que presentan una sintomatología semejante a una amebiasis. Los valores obtenidos muestran una sensibilidad de 100% y una especificidad de 94.7%, con un valor predictivo positivo de 92.3% y un valor predictivo negativo de 100% y una correlación de 96.8% para el *E. histolytica* II (30).

Otras muestras en las que este kit ha sido utilizado incluyen saliva, suero y fluido de absceso. En un estudio realizado en saliva, en pacientes con absceso hepático, se encuentra una sensibilidad del 22% y una especificidad del 97.4% (9). En Dhaka, Bangladesh, se realizó un estudio para la detección de *E. histolytica* de pacientes con absceso hepático utilizando suero y la detección de amebiasis intestinal con muestras de heces diarreicas, del cual obtuvieron una sensibilidad de 95.7% para el análisis de suero y un 100% de sensibilidad para el análisis de heces (21).

El uso de ELISA para detección de antígenos, es mejor que el uso de kits para detección de anticuerpos en suero contra *E. histolytica,* sobre todo en países endémicos, debido a la dificultad de distinguir infecciones recientes de infecciones pasadas (9, 10). No obstante la detección de antígenos a través de kits, como el utilizado en este trabajo, también presenta sus dificultades. Estas pruebas fueron diseñadas con el objetivo de ser

utilizadas en países de alta prevalencia de *E. histolytica,* lo que muestra un inconveniente en su uso en países de baja prevalencia, además la mayoría de experiencias con el uso de este kit son realizadas en Bangladesh lo que muestra una realidad para un área determinada, donde las condiciones pueden ser únicas.

Como conclusión el kit utilizado en este trabajo presenta una serie de desventajas como su elevado costo, la necesidad de un paso previo de cultivo, tiempo de análisis, entre otras. Esto hace que su posible aplicación en los laboratorios clínicos del país no sea recomendada por nosotros.

Es necesario la implementación de nuevos test para la diferenciación de *E. histolytica* de *E. dispar,* o el uso de estas técnicas con el mejoramiento de algunas metodologías, como el aislamiento en cultivos, con disminución en los costos y el tiempo.

Lo ideal sería desarrollar una técnica donde se pueda determinar antígeno específico de *E. histolytica* en muestras de suero o evidenciar la presencia de una infección reciente mediante títulos de anticuerpos.

Conclusiones

- El porcentaje de muestras positivas por *E. histolytica* fue de un 9.9%, lo que coincide con los estudios realizados en el país (Reyes et al).

- El aislamiento de *E. histolytica /E. dispar* mediante el uso de cultivos es una técnica que requiere de mucho tiempo y cuidados para lograr mantener los trofozoitos, los cuales son poco resistentes en al medio externo.

- La aplicación del El kit TechLab *Entamoeba histolytica* II presenta inconvenientes como: es necesario el aislamiento previo mediante cultivos, poca factibilidad de uso en clínicas y costos tanto económicos como de tiempo.

- Se muestra la necesidad de contar con pruebas diagnósticas específicas para la detección de *E. histolytica,* tanto en la clínica como a nivel epidemiológico.

- La proporción de *E. dispar* en las muestras analizadas es mayor que la de *E. histolytica.*

Referencias

1. Losch F. Massive development of amoebae in the large intestine En: Kean B H, Mott KE, Russell AJ, eds. **Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations volumen 1** London, UK: Cornell University Press; 1978. 71-79.

2. **Reyes L, León R.** Diferenciación de *Entamoeba histolytica /Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal, *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 2002; 23: 161-173.

3. Beaver C, Jung C, Cupp E. **Parasitología Clínica,** 2ed., D.F. México: Editorial Salvat, 1994: 113-139.

4. **Jackson T.** *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *International Journal for Parasitology 1998;* 28: 181–186.

5. **Chacín L.** Relevancia del reconocimiento de *Entamoeba dispar* en la amibiasis *Invest. Clín* 2001; 42: 134- 140.

6. **Sargeaunt P, Williams J, Greene J.** The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1978; 72: 519-521.

7. **Sargeaunt P, Jackson T, Simjee A.** Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. *Lancet*, 1982; 1: 1386-1388.

8. **Gathiram V, Jackson T**. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. *Lancet* 1985; 1: 719-721.

9. **Tanyuksel M, Petri W.** Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 713 – 729.

10. **Huston C, Haque R, Petri W.** Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Exp. Rev. Mol. Med.* 1999 http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99000599h.htm

11. Castro A, Guerrero O. **Técnicas de diagnóstico parasitológico** Editorial Universidad de Costa Rica. San José Costa Ri ca 2004

12. **Stanley S.** Pathophysiology of amoebiasis. *TRENDS in Parasitology* 2001; 17: 280 – 285.

13. **Meza I.** Extracellular matrix – induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitology Today* 2000; 16: 23 – 28.

14. **Espinoza M, Martínez A.** Patogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 318-331.

15. **Chadee K, Petri W, Innes D, Ravdin J.** Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica J.Clin.Invest.*1987; 80: 1245 – 1254.

16. **Yau Y, Crandall I, Kain K.** Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples *J.Clin.Microbiol.* 2001; 39: 716 – 719.

17. **Pillai D, Kobayashi S, Kain, K.** *Entamoeba dispar:* molecular characterization of the Galactose/ N-Acetyl-D-galactosamine Lectin *Experimental Parasitology* 2001; 99: 226-234.

18. **Lotter H, Zhang T, Seydel K, Stanley S, Tannich E.** Identification of and epitope on the *Entamoeba histolytica* 170 kD Lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis *J. Exp. Med.* 1997; 185: 1793-1801.

19. **Jackson T, Ravdin J.** Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections, *Parasitology Today* 1996; 12: 406 – 409.

20. **Que X, Reed S.** Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 196-206

21. **Haque R, Uddin N, Karim I, Alam K, Eubanks A, Lyerly D, Petri W.** Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody test *J.Clin.Microbiol.* 2000; 38: 3235 – 3239.

22. **Morales M, Esquivel M, Sancho Y, Murillo A.** Estudio comparativo sobre parasitismo en niños de la comunidad de Torremolinos, Cantón de Desamparados en los años 1989 y 1994. *Acta Ped. Costasrric.* 1995; 9: 109 -111.

23. **Kenton R, Rojas O.** Parasitosis intestinales en la provincia de Limón. *Rev. Med. Costa Rica* 1982; 47: 71-74.

24. **Graham C, Diamond L.** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 329 – 341.

25. **Conde M, Zerpa C**. *Entamoeba histolytica*: un desafio vigente *Salud Pública de México*. 1992; 34: 335-341

26. **Romero P, Rober L, Muñoz R, Alarcón A, Tay J, Sánchez J**. Tratamiento profiláctico con quinfamida para el control comunitario de las infecciones

intestinales por *Entamoeba histolytica Parasitol. Día* 1997; 21: 0716-0720.

27. **Upcroft P, Upcroft J.** Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14: 150-164.

28. **Knight R.** The chemotherapy of amoebiasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1980; 6: 577-593

29. **Sánchez G.** Estado actual de la amibiasis *Cir Ciruj* 1997; 65: 151-156.

Sitio Web:

30. http:// www.TechLab.com/ Catálogo N° T5017 (96 Tests)

Apéndice I

Componentes de la tinción utilizada

- Tinción

Reactivos de Hematoxilina Férrica de Heidenhain

Hematoxilina.....1g
Alcohol etílico de 95°.....10 mL
Agua destilada.....100 mL

Fijador de Schaudinn

Solución acuosa saturada de bicloruro de mercurio
($HgCl_2$ al 7.85%).....67mL
Alcohol de 95°.....33mL
Ácido acético glacial 2%.

Apéndice II

Componentes del medio de cultivo utilizado

- Medio de Cultivo

Reactivos Medio Dobell y Laidlaw modificado

Fase Sólida

Suero de Buey en cada uno de varios tubos estériles de 2 a 3 mL.

Fase Líquida

Suero de buey.....100 mL

Solución de Ringer .....100 mL

Agua destilada .....800 mL

Almidón de arroz.....5 mg

Penicilina .....100 UI

Estreptomicina .....100 mg/mL

Apéndice III

Datos espectrofotométricos obtenidos al correr el ELISA

Cuadro I Resultados obtenidos de los diferentes corridas realizadas con el Kit TechLab *E. histolytica* II de muestras positivas por *E. histolytica /E. dispar*

Muestra	Densidad Optica
01 (cultivo)	0.005
02 (cultivo)	0.006
03 (cultivo)	0.008
04 (cultivo)	-0.457
05 (cultivo)	-0.519
06 (cultivo)	-0.417
07 (cultivo)	2.761
08 (cultivo)	-0.001
09 (cultivo)	-0.002
10 (cultivo)	-0.003
11 (cultivo)	-0.003
12 (cultivo)	-0.001
13 (cultivo)	0.640
14 (cultivo)	0.003
15 (cultivo)	0.004
16 (cultivo)	-0.001
17 (cultivo)	-0.001
18 (cultivo)	0.006
19 (cultivo)	0.005
20 (cultivo)	0.002
21 (cultivo)	-0.002
22 (cultivo)	0.000
23 (cultivo)	0.001

24 (cultivo)	0.038
25 (cultivo)	-0.002
26 (cultivo)	0.006
27 (cultivo)	0.001
28 (cultivo)	-0.002
29 (cultivo)	0.056
30 (cultivo)	0.173
31 (cultivo)	-0.042
32 (cultivo)	-0.057
33 (cultivo)	0.027
34 (cultivo)	-0.050
35 (cultivo)	-0.098
36 (cultivo)	Incoloro
37 (cultivo)	Incoloro
38 (cultivo)	Incoloro
39 (cultivo)	Incoloro
40 (cultivo)	Incoloro
41 (cultivo)	Incoloro
42 (cultivo)	Incoloro
43 (cultivo)	Incoloro
44 (cultivo)	Incoloro

Las últimas 9 muestras se analizaron por interpretación visual. Para cada corrida se corrió un control positivo y negativo que validó los resultados.