
**DEMOSTRACIÓN, MEDIANTE ENZYMEBA, DEL
SOBREDIAGNÓSTICO DE AMEBIASIS INTESTINAL
ASOCIADO AL EXAMEN MICROSCÓPICO DE HECES.
REPORTE DE UN ESTUDIO EN CIENFUEGOS, CUBA**

Luis Fonte,¹ María A. Fernández,² Lizet Sánchez,¹ Humberto Marín,³ Yury O. Núñez¹ y Ivón Montano¹

RESUMEN

El sobrediagnóstico microscópico de amebiasis intestinal ha sido ampliamente reportado, pero pocas veces objetivamente demostrado. En el presente trabajo, empleando EnzymeBa, un procedimiento diagnóstico de amebiasis intestinal desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", Ciudad de La Habana, abordamos este problema. Durante seis meses se colectaron en los servicios de parasitología de la casi totalidad de los policlínicos (13 de 14), y de los dos mayores hospitales (2 de 3) de la provincia de Cienfuegos, todas las muestras de heces en las que el personal técnico correspondiente había informado la detección por observación microscópica de uno o más estadíos de *Entamoeba histolytica*. En sólo 61 (14.4%) de 424 muestras colectadas EnzymeBa confirmó el hallazgo microscópico previo. No encontramos diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre la eficiencia del diagnóstico microscópico en los hospitales y en los policlínicos de aquella provincia.

PALABRAS CLAVES: Amebiasis. Sobrediagnóstico microscópico. EnzymeBa.

INTRODUCCIÓN

El examen microscópico de heces continúa siendo el procedimiento de laboratorio más ampliamente utilizado para el diagnóstico de amebiasis

1 Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", Autopista Novia del Mediodía km 6½, Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de la Habana, Cuba. Fax: 53-7-215957. e-mail: fonte@ipk.sld.cu

2 Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Ciudad de la Habana, Cuba.

3 Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba.

Endereço para correspondência: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", Autopista Novia del Mediodía km 6½, Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de la Habana, Cuba.

Fax: 53-7-215957. e-mail: fonte@ipk.sld.cu

Recebido para publicação em 15/05/98. Revisto em 10/09/98. Aceito em 19/09/98.

intestinal (Bruckner, 1992; Ravdin, 1995). Sin embargo, este método tiene importantes limitaciones: en primer lugar, la excreción intermitente de quistes de *Entamoeba histolytica* obliga a la realización de al menos tres exámenes por paciente para solo detectar 80% de las infecciones (Walsh, 1986); en segundo lugar, sobre todo cuando la prueba es realizada por personal insuficientemente entrenado, el parecido de los diferentes estadios de *E. histolytica* con otras estructuras que pueden estar presentes en las heces frecuentemente conduce a falsos diagnósticos de amebiasis (Anaya & Sabanero, 1989). A estas limitaciones se suma que la observación microscópica de heces, sobre todo cuando se visualizan quistes, no permite distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar* (Diamond & Clark, 1993; WHO, 1997).

Algunas pruebas serológicas han sido útiles en el diagnóstico indirecto de las formas extraintestinales de amebiasis, en particular del absceso hepático (Madison, 1991). Sin embargo, para las formas intestinales estos exámenes no han representado una solución eficiente al problema de su diagnóstico (Ravdini, 1995). Sistemas para la detección de antígenos en heces han sido recientemente desarrollados (Haque et al., 1993; Abd-Alla et al., 1993; González-Ruiz et al., 1994; Haque et al., 1995; Urdaneta et al., 1996; Jackson & Ravdin, 1996). Al menos uno de ellos, que permite la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*, ya se comercializa; pero por su relativo alto costo aún no está disponible para su uso regular en la mayoría de los servicios parasitológicos.

En 1988, Luaces y colaboradores (Luaces et al., 1988) describieron una proteasa de *E. histolytica* a la que nombraron histolisaina. Posteriormente, Luaces y cols. (Luaces et al., 1992a; Luaces et al., 1992b) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (Enzymeaba) para la detección de histolisaina en heces, siendo éste el primer procedimiento diagnóstico en que el propio parásito aporta la enzima (histolisaina) que revela su presencia. La eficacia de este procedimiento fue probada en sendos estudios realizados en Mérida, México (Comisión de Expertos de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 1992) y en Ciudad de La Habana, Cuba (Fonte et al., 1998).

El sobrediagnóstico de amebiasis intestinal, en particular la cuantía de éste, ha sido hasta el presente un problema ampliamente reportado pero pocas veces objetivamente demostrado. Teniendo en cuenta las bondades de Enzymeaba, en especial el hecho de que sus altos índices de sensibilidad y especificidad no dependen de la subjetividad asociada a un observador (Luaces et al., 1992a; Luaces et al., 1992b; Comisión de Expertos de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 1992; Fonte et al., 1998), decidimos demostrar con precisión la presencia, y cuantía, del sobrediagnóstico de amebiasis asociado al examen microscópico de heces en la provincia de Cienfuegos, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de heces

La provincia de Cienfuegos es una de las catorce en que está dividida el territorio cubano. Esta, a su vez, está constituida por ocho municipios: Cienfuegos, el municipio capital de la provincia y siete municipios periféricos, fundamentalmente rurales.

Durante los meses de mayo a octubre de 1996 se colectaron en los Hospitales Clínico-Quirúrgicos "Gustavo Aldereguía" y Pediátrico "Paquito González" de Cienfuegos y en prácticamente todos los policlínicos (13 de 14) de aquella provincia, muestras fecales en las que los técnicos de laboratorio de los citados centros asistenciales habían detectado por observación microscópica uno o más estadios de *Entamoeba histolytica*. En todos los casos, el diagnóstico coproparasitológico había sido realizado mediante examen directo con coloración de Lugol; en algunas muestras sobre las que existieron dudas diagnósticas emplearon, además, la observación con tinción tricrómica. Se consideró a un individuo positivo por observación microscópica cuando en uno de tres exámenes realizados los técnicos informaron, según sus criterios, la presencia de uno o más estadios de *E. histolytica*. Durante el periodo en que se colectaron las muestras supuestamente positivas, los técnicos de laboratorio no conocían que con las mismas se haría un estudio de la calidad del diagnóstico microscópico que realizaban.

Todas las muestras fueron conservadas, congeladas (debido a que después se emplearía Enzymeaba, no era posible la utilización de preservantes), en las respectivas instituciones en que se realizó el diagnóstico primario. De estas fueron transportadas, también congeladas, al Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de la provincia Cienfuegos y de allí en iguales condiciones, al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

Con la intención de confirmar con una herramienta más objetiva el diagnóstico microscópico previo, una vez las muestras de heces en el IPK, a las mismas se les realizó Enzymeaba

2. Obtención de anticuerpos antihistolisaina

La histolisaina se purificó según describieran Luaces y Barret en 1988 (Luaces y Barret, 1988). Para la obtención de anticuerpos contra esta enzima se procedió de la siguiente manera: dos conejos Chinchilla de 2-3 kg de peso fueron inmunizados subcutáneamente con 500 µg de la proteína diluida en 0.5 ml de solución salina tamponada (PBS) (0.1 M, pH 7.2) y emulsificada en igual volumen de adyuvante completo de Freund. A

intervalos de dos semanas, ambos conejos fueron inmunizados en otras nueve ocasiones con cantidades decrecientes de la enzima (50 µg menos de por vez, hasta inocular sólo 50 µg en la última de ellas) emulsificada en igual volumen de adyuvante incompleto de Freund. Una semana después de la décima inmunización los conejos fueron sangrados. De la sangre colectada fue separado el suero y de este se obtuvo una preparación cruda de inmunoglobulinas mediante precipitación en sulfato de amonio, siguiendo una metodología similar a la empleada por Luaces y cols. en 1992 (Luaces).

3. Enzymeaba

Enzymeaba se realizó según reportó Luaces y cols. en 1992, con algunas modificaciones. Placas de poliestireno de fondo plano y de 96 pocillos (Marxisorp, NUNC) fueron sensibilizadas durante 16 horas a 4°C con 125 µl/pocillo de una solución 0.1 M de carbonato de sodio pH 9.6, contentiva de anticuerpos antihistolisaina obtenidos en conejo (5 µg/ml). Los sitios no recubiertos por los anticuerpos fueron bloqueados durante 2 horas a 37°C con 150 µl/pocillo de seroalbúmina bovina al 0.1% en PBS (0.1 M, pH 7.2). Transcurrida esta incubación, se eliminó el agente bloqueante en exceso y se añadieron 100 µl del sobrenadante de las muestras de heces previamente diluidas (1g de heces diluido en 3 ml de agua destilada y dejado reposar durante 15 minutos).

Después de 4 horas en contacto con la placa a 4°C el material no "capturado" fue desechado y tras cuatro lavados con Tween-20 al 0.05% en PBS (PBS-T) en los pocillos fueron colocados 100 µl de 100 mM Benziloxycarbonil-L Arginil-L Arginine 2-(4-metoxi) naphthylamida (z-arg-arg Mna), Bachem, Suiza, en solución 50 mM glicina-EDTA pH 9.5 que contenía, además, L-cysteina 2 mM.

Luego de 16 horas de incubación a 37°C, la acción de la enzima capturada fue revelada mediante la adición de 100 µl de una solución que contenía p-cloro mercuribenzoato 5 mM, Fast garnet 22.5µg/µl, EDTA 25 mM y Tween 20 al 1% pH 6.0. La aparición inmediata de color rosado (de diferente intensidad) fue considerada como un resultado positivo, y negativo en aquellos pocillos cuyo contenido continuo amarillo. En cada ensayo se utilizaron dos controles (positivo y negativo).

4. Análisis Estadístico

Se empleó una prueba de comparación de proporciones para analizar la diferencia entre grupos (hospitales y policlínicos). Se consideró como nivel de significación un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron en los ocho municipios de la provincia Cienfuegos un total de 448 muestras de heces en las que el personal técnico de los centros asistenciales incluidos en el estudio había informado la detección por examen microscópico de uno o más estadios de *E. histolytica*. Veinticuatro de ellas fueron descartadas por no haber sido transportadas al IPK en condiciones de congelación. En relación con las 424 muestras restantes, fue informada la presencia de quistes en 412 (97.2%), trofozoitos, ninguno hematófago, en 11 (2.6%) y quistes y trofozoitos en 1 (0.2%).

La tabla 1 muestra los resultados del estudio de la eficacia del diagnóstico morfológico en la provincia Cienfuegos. Como puede observarse, de las 424 muestras finalmente incluidas en el estudio, sólo 61 (14.4%) fueron positivas a Enzymeaba. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la calidad del diagnóstico en los hospitales (18.2% de eficacia) y la de los policlínicos (13.8%) ($p > 0.05$).

Tabla 1. Resultados de la aplicación de Enzymeaba a muestras de heces informadas positivas a *E. histolytica* por examen microscópico en hospitales y policlínicos de la provincia Cienfuegos

	N.º de muestras	Enzymeaba positivas	Porcentaje
Hospitales	55	10	18.2
Policlínicos	369	51	13.8
Totales	424	61	14.4

$p > 0.05$

Tres estudios anteriores (Luaces et al., 1992; Comisión de Expertos de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 1992; Fonte et al., 1998) demostraron que el procedimiento Enzymeaba para el diagnóstico de amebiasis es altamente eficiente y sólo requiere la realización del ensayo en una muestra por paciente para la obtención de un diagnóstico acertado (Enzymeaba detecta una proteasa excretada por las amebas en el lumen intestinal y, por tanto, son posibles resultados positivos aún en ausencia de quistes y trofozoitos en las heces). Este procedimiento, a diferencia de los demás ensayos inmunoenzimáticos, no requiere de enzimas conjugadas, pues el propio parásito aporta la enzima que detecta su presencia. En este hecho radica su doble fuente de especificidad, la del anticuerpo por el antígeno (la enzima) y la de la enzima por su sustrato colorimétrico.

Los resultados arriba mencionados nos demuestran, por tanto, que existe un marcado sobrediagnóstico microscópico de amebiasis intestinal en los centros de salud de la provincia Cienfuegos.

El sobrediagnóstico de amebiasis intestinal asociado al examen microscópico de heces se reporta cada vez con más frecuencia (Krogstad et al., 1978; Walsh, 1986; Anaya & Sabanero, 1989; Matijasevic, 1995). Nuestro trabajo, a diferencia de los estudios precedentes, emplea para demostrar y cuantificar los falsos diagnósticos de amebiasis una herramienta diferente (y más objetiva) a la propia observación microscópica de heces.

Este problema del sobrediagnóstico de amebiasis intestinal conduce al uso innecesario, cuando no yatrógeno, de drogas amebicidas. Su solución debe ser abordada de forma multidisciplinaria. Una alternativa al empleo del examen microscópico de heces podría ser el uso de procedimientos más sensibles y específicos para la detección de infección intestinal por *E. histolytica* (Jackson & Ravdin, 1996; WHO, 1997). Pero estos, por su relativo alto costo, aún no están disponibles para un uso regular en la mayoría de los servicios parasitológicos. Por este motivo, y por el hecho de que la observación microscópica de heces permite la detección de una amplia gama de parásitos en una misma prueba, el diagnóstico morfológico debe ser perfeccionado. Para incursionar en los factores que condicionan los falsos diagnósticos microscópicos de amebiasis, y posiblemente de otras parasitosis, actualmente aplicamos encuestas sobre percepciones, conocimientos y prácticas relacionadas con este problema, a técnicos de laboratorio, a responsables de éstos y a médicos de la provincia de Cienfuegos.

SUMMARY

Demonstration, using Enzyme test, of the overdiagnosis of intestinal amebiasis associated to the microscopical examination of faeces. Report of a study in Cienfuegos, Cuba.

The overdiagnosis of amebiasis has been widely reported, but not rigorously demonstrated. We confronted this issue utilizing Enzyme test, a diagnostic method for intestinal amebiasis developed at the Tropical Medicine Institute "Pedro Kouri", Havana City. From 424 faecal samples collected at the parasitology division of almost all local polyclinics (13 of 14), and two of the largest hospitals (2 of 3) belonging to the province of Cienfuegos, in only 61 (14.4%) Enzyme test confirmed the microscopic diagnosis. We did not find statistically significant differences ($p > 0.05$) between the microscopic diagnosis at the hospitals and at the local polyclinics.

KEYWORDS: Amebiasis. Microscopical overdiagnosis. Enzyme test.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M.D.; Jackson, T., Gathiran, V. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigena in sera and feces. *J. Clin. Microbiol.* 31:2845-2850, 1993.
- Anaya, F. & Sabanero, G. Use of wrights stain to identify *Entamoeba histolytica* trophozoites in feces. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:210, 1989
- Bruckner, D.A. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:356-369, 1992.
- Comision de Expertos de la Universidad Autonoma de Yucatan. Informe de estudio de validación del método diagnóstico de amebiasis Enzymera en el Centro de Investigaciones Regionales Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 1992.
- Diamond, L., Clark, C. G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* 40: 340-344, 1993.
- Fonte, L.; Nunez, F.; Montalvo, A.; Rojas, L.; Galloso, M.; Ginorio, D.; Hernandez, M.; Vázquez, A. & Ramirez, A. Validación en Ciudad Habana, Cuba, de Enzymera, inmunoensayo para la detección en heces de *Entamoeba histolytica*. *Rev. Cub. Med. Trop.* 50:33-36, 1998.
- Gonzalez-Ruiz, A.; Haque, R.; Rehman, T.; Aguirre, A.; Hall, A.; Guhl, F.; Warhurst, D., Miles, M. A. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 32:964-970, 1994.
- Haque, R.; Kress, K.; Wood, S.; Jackson, T. F.; Lyster, D.; Wilkins, T., Petri, W. A. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J. Infect. Dis.* 167:247-249, 1993.
- Haque, R.; Neville, L.; Hahan, P., Petri, W. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J. Clin. Microbiol.* 33:2558-2561, 1995.
- Jackson, T., Ravdin, J. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Parasitol. Today* 12:406-409, 1996.
- Krogstad, D. J.; Spencer, H. C.; Healy, D. R.; Gleason, N. N.; Sexton, D. J., Herion C. A. Amebiasis: Epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *An. Int. Med.* 88:89-97, 1978.
- Luaces, A. L., Barret, A. J. Affinity purification and biochemical characterization of histolysain: the cystein proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 250:903-909, 1988.
- Luaces, A. L.; Picó, T., Barret, A. J. The Enzymera test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immunoenzymatic detection of histolysain. *Parasitology* 105:203-205, 1992a.
- Luaces, A. L.; Osorio, L., Barret, A. J. A new test for infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. today* 9: 69-71, 1992b.
- Madison, S. Serodiagnosis of parasitic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:457-469, 1991.
- Matijasevic, E.A. Amebiasis. Espectro Clínico y tratamiento. *Trib. Méd.* 91:290-304, 1995.
- Ravdin, J. I. Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 20:1453-1466, 1995.
- Urdaneta, H.; Rangel, A.; Martins, M.; Munoz, J. F., Hernandez, M. *Entamoeba histolytica*: fecal antigen capture immunoassay for the diagnosis of enteric amebiasis by a monoclonal antibody. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo* 38:39-44, 1996.
- Walsh, J. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228-238, 1986.
- Who/Paho/Unesco report of a consultation of experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997.