

Enzymeaba. Método efectivo para estudios de prevalencia de infección intestinal por *Entamoeba histolytica*.*

Luis Fonte Galindo,** Fidel Núñez Fernández,** Lázara Rojas Rivero,** Ana Margarita Montalvo Alvarez,**
Esteban Alberti Amados,** Carlos Finlay Villalvilla***

RESUMEN. El desarrollo de procedimientos que permita diagnóstico eficaz de amebiasis intestinal tiene gran importancia epidemiológica. Fue valorada la eficacia de Enzymeaba, examen inmunoenzimático para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces empleando una sola muestra por individuo pues se demostró *E. histolytica* en 27 de los 686 participantes en el mismo. La observación microscópica de heces sólo igualó el resultado de Enzymeaba cuando fueron analizados los resultados de ambos procedimientos sobre tres muestras de cada uno de los individuos en el estudio. Por su alta sensibilidad, requerir de una sola muestra por persona encuestada y ser un inmunoanálisis realizable en condiciones mínimas de laboratorio, Enzymeaba es una herramienta muy útil para estudios de prevalencia.

Palabras clave: Amebiasis, Enzymeaba.

La amebiasis es la infección intestinal producida en el hombre por *Entamoeba histolytica*.¹ Han sido descritas² formas patógenas y no patógenas de este protozoo. Recientemente, se ha sugerido que ambas formas constituyen especies separadas.³ La detección de *E. histolytica* en heces tradicionalmente se ha basado en el hallazgo de los quistes y/o trofozoitos correspondientes en el examen microscópico de materia fecal. Sin embargo, este procedimiento posee limitaciones importantes, entre otras, la excreción de quistes es intermitente, por lo que se requiere al menos de tres exámenes en días sucesivos para sólo detectar 90% de los casos;⁴ los procedimientos microscópicos habituales tienen poca sensibilidad cuando son realizados por personal no bien entrenado; frecuentemente otras células en heces, en particular leucocitos, se identifican erróneamente como quistes *E. histolytica*.⁵

La mayoría de los informes sobre la prevalencia de la amebiasis intestinal ofrecen, en el mejor de los casos, resul-

SUMMARY. The development of diagnostic methods for studying amebiasis prevalence is of great epidemiological importance. The efficacy of Enzymeaba, immunoenzymatic assay for the detection in heces of *Entamoeba histolytica*, was studied. Enzymeaba employing only one sample from each participants in the study, showed infection by *E. histolytica* in 27 of 686 participants in the study. The microscopy observation of heces obtained the same results of Enzymeaba when were done on three samples from each individual. Because its high sensibility, the requirement of only one sample from each persons and the use of minimal laboratory conditions, Enzymeaba is a very useful tool for prevalence studies.

Key words: Amebiasis, prevalence, Enzymeaba.

tados aproximados, debido a que fueron realizados en individuos seleccionados, tales como hospitalizados que por algún motivo han requerido asistencia médica.⁶ Las prevalencias verdaderas, que deben derivarse de la búsqueda en poblaciones no seleccionadas, no son conocidas. A ello se agrega que estos estudios se hicieron mediante la observación microscópica de una sola muestra como herramienta para detectar la infección y de ello se deriva como expresamos antes, falsos diagnósticos de amebiasis.

Se ha desarrollado un nuevo procedimiento para detectar infección con *E. histolytica* en heces.^{7,8} Esta técnica, nombrada Enzymeaba, está basada en la detección de una proteína de *E. histolytica*, histolisina, purificada y caracterizada en 1988 por Luaces y Barret.⁹ Teniendo en cuenta las bondades de Enzymeaba, en particular que sólo necesita una muestra de heces por persona para un diagnóstico efectivo,^{7,8} decidimos estudiar la factibilidad de su empleo en estudios de prevalencia.

Materiales y métodos

Población. El estudio se hizo en 404 estudiantes con edades entre 11 y 17 años y 282 personas relacionadas (maestros, personal no docente de la escuela y familiares de ambos) en dos escuelas de enseñanza media de la Ciudad de

* Informe parcial de trabajo presentado en las XIII Jornadas Venezolanas de Microbiología, Noviembre de 1994, Mérida, Venezuela.

** Investigador, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

*** Subdirector de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical, "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

La Habana. Se recogieron tres muestras de heces de cada individuo y fueron estudiadas parasitológicamente.

Métodos de examen. A cada muestra se le realizó examen microscópico directo usando eosina y lugol, y se concentró una porción de la muestra por el método de Ritchie.¹⁰ Otra porción de la muestra fue congelada a -10 °C hasta su procedimiento por Enzymebs.

El método de Enzymebs, un inmunoanálisis producido en forma comercial por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", La Habana, Cuba, fue empleado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, basadas en el proceder descrito por Luaces.⁷ El valor de corte fue determinado calculando la media de las densidades ópticas (DO) de los casos negativos más dos desviaciones estándar y fue de 0.824.

Los resultados pudieron verificarse a simple vista o cuantificarse espectrofotométricamente midiendo en un lector de inmunoanálisis (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, Mclean, Va.) a 520 nm.

Tratamiento. Todas las personas positivas a *E. histolytica* no presentaban síntomas clínicos de amebiasis y fueron tratadas con furoato de diloxanida, un amebicida luminal, libre de efectos colaterales serios de contraindicaciones.¹¹ La dosis suministrada fue 500 mg tres veces al día durante 10 días. Cuando el ciclo del tratamiento terminó, se recogie-

Cuadro 1. Resultados de Enzymebs y observación microscópica realizados a tres muestras de heces por participantes en días alternos.

		Positivos	Negativos	Totales
Examen	Positivos	27	0	27
Microscópico	Negativos	0	659	659
Total		27	659	686

Todos los positivos lo fueron en las tres muestras.

De los 27 positivos, 15, 7 y 5 lo resultaron por primera vez en la 1a, 2a. y 3a. muestra, respectivamente.

ron otras tres muestras de heces en días alternos comenzando al séptimo día después del tratamiento. La primera muestra fue procesada por microscopia y Enzymebs, y las otras sólo por microscopia.

Resultados

De las 686 personas que participaron en el estudio, en 27 se detectó por observación microscópica y por Enzymebs la presencia de *E. histolytica* (Cuadro 1). Sin embargo, todos los casos positivos lo fueron por Enzymebs desde la primera muestra, no ocurriendo así con la observación microscópica, pues con éstas el número de casos positivos se acercó e

Cuadro 2. Resultados de Enzymebs y de la observación microscópica de heces, realizados antes y después del tratamiento, en 27 individuos infectados con *Entamoeba histolytica* y tratados con furoato de diloxanida.

Presencia de quistes de <i>E. histolytica</i>		Densidad óptica (DO) Valores en Enzymebs*	
Pretratamiento	Postratamiento	Pretratamiento	Postratamiento
+	-	1.162	0.211
+	-	2.113	0.235
+	-	2.161	0.186
+	-	2.021	0.216
+	-	2.183	0.173
+	-	2.121	0.301
+	-	1.720	0.245
+	-	1.410	0.312
+	-	1.620	0.116
+	-	1.720	0.171
+	-	1.640	0.225
+	-	0.980	0.210
+	-	0.971	0.172
+	-	1.340	0.183
+	-	1.820	0.201
+	-	0.850	0.193
+	-	0.848	0.113
+	-	0.991	0.173
+	-	1.810	0.178
+	-	2.011	0.188
+	-	1.811	0.275
+	-	2.076	0.275
+	-	2.010	0.210
+	-	2.211	0.183
+	-	1.890	0.121
+	-	1.315	0.139
+	-	2.136	0.210

*Un valor de densidad óptica < 0.824 (punto de corte) fue considerado un negativo para Enzymebs.

igualó al de Enzymeaba en la medida en que aumentó el número de muestras por individuo involucrado en el estudio (15 lo fueron con la primera muestra; 7 y 5 resultaron positivos por primera vez con la segunda y tercera muestra, respectivamente).

Para verificar los resultados obtenidos por ambos métodos, a los 27 individuos positivos se les trató con furoato de diloxanida y la infección, como se muestra en el *cuadro 2*, fue eliminada en todos ellos. Esto fue comprobado tanto por microscopía como por Enzymeaba. En el caso de esta última prueba, y como también puede observarse en el *cuadro 2*, todos los valores de DO obtenida, caen por debajo del valor de corte después del tratamiento amebicida. Ello se corresponde con la diferencia estadísticamente significativa de los valores antes y después del tratamiento (prueba *t* de Student $p < 0.001$).

Discusión

Ha sido estimado que aproximadamente 12 millones de personas, 12% de la población mundial, está infectada por *E. histolytica*.⁴ Sin embargo, la cifra de prevalencia de la infección varía considerablemente de un área geográfica a otra. Ello obedece junto a las diferentes condiciones climatológicas e higiénico sanitarias, a los métodos de detección utilizados en cada estudio y, en caso de la observación microscópica de heces, al número de muestras tomadas por cada individuo encuestado.⁵

Enzymeaba detecta una proteinasa excretada por cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* con independencia de que quistes y trofozoítos de este protozoo estén presentes en la muestra problema.⁷ Nuestro trabajo demuestra que, a diferencia del examen microscópico de heces, con Enzymeaba es suficiente el estudio de una muestra por individuo para conocer si éste está infectado por *E. histolytica*.

En este estudio, los resultados de Enzymeaba coincidieron con los de la observación microscópica de heces cuando ésta se realizó a tres muestras por individuo en el estudio. La objetividad de estos resultados se demostró con la negativización de los mismos tras el tratamiento amebicida correspondiente. En nuestra casuística se empleó furoato de diloxanida, un amebicida luminal, por dos razones: porque ninguno de los individuos tenían síntomas clínicos y porque la forma "portadores asintomáticos", asociada a zimodemos no patógenos es la forma más común de la amebiasis intestinal en Cuba.¹³

Enzymeaba emplea un sustrato cuya hidrólisis, una vez detenida la reacción, produce una coloración roja fácilmente distinguible del amarillo de base que permanece en los pocillos en que se efectúan la prueba cuando la hidrólisis no tiene lugar. Esta ventaja de Enzymeaba permite su utilización en condiciones mínimas de laboratorio, pues no requiere el uso obligatorio de un lector ELISA.

Las ventajas de Enzymeaba a que hemos hecho referencia, en particular su sensibilidad, que emplea una sola muestra por paciente y que no requiere, a diferencia de los otros exámenes inmunoenzimáticos, de un lector ELISA, hacen de este procedimiento una herramienta muy útil en estudios de prevalencia.

Referencias

1. Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:115-118.
2. Sargeant PG, Williams JE. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:519-521.
3. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica*. Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911): separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eur Microbiol* 1993;40:340-344.
4. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global morbidity and mortality. *Rev Inf Dis* 1986;8:228-238.
5. Bruchner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:356-369.
6. Chacin-Bonilla E, Parra AM, Estévez J, Morales LM, Suárez H. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites in community from Maracaibo, Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86:373-380.
7. Lauces AL, Barret AJ. The Enzymeaba test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immuno-enzymatic detection of histolysin. *Parasitol* 1992;105:203-205.
8. Lauces AL, Osorio LM, Barret AJ. A new test for infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today* 1993;9:69-71.
9. Lauces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1988;250:903-909.
10. Ash LR, Orihel TC. *Parasites: a guide to laboratory procedures and identification*. ASCP Press, Chicago. 1987:18-26.
11. Organización Mundial de la Salud, Grupo Científico de Trabajo. Infecciones intestinales de protozoos y helmintos. Informe de un Grupo Científico de la OMS. Serie de Informes Técnicos OMS. 1981;666:117-118.
12. Guerrant RL. The global problem of amebiasis: Current status, research needs, and opportunities of progress. *Rev Infect Dis* 1986;8:218-227.
13. Mendiola J, Peláez E, Carballo D, Rabasa D. Caracterización isoenzimática de cepas de *Entamoeba histolytica* aisladas de pacientes cubanos y extranjeros procedentes de Africa. *Rev Cub Med Trop* 1991;43:85-89.