

Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* por Microscopía y ELISA en Muestras Fecales de una Población Urbano Marginal de Lima

WILLIAM CORNEJO¹, YRMA ESPINOZA^{1,2}, ALINA HUIZA^{1,2}, PILAR ALVA¹,
ROXANA SUAREZ¹, CARLOS SEVILLA y CÉSAR NÁQUIRA^{1,2}

¹Departamento Académico de Microbiología Médica y ²Sección Científica de Parasitología,
Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", Facultad de Medicina, UNMSM

RESUMEN

OBJETIVOS: El propósito del presente estudio fue utilizar pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) para estudiar la prevalencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en una localidad urbano marginal de Lima (Callao). **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se utilizaron dos ELISA: uno que detecta *E. histolytica* y *E. dispar* (ELISA *Entamoeba*), y otro que identifica específicamente a *E. histolytica*. **RESULTADOS:** Se obtuvieron aleatoriamente 128 muestras de heces, de las cuales 13 (10%) fueron positivas por microscopía a *E. histolytica* o *E. dispar*, siendo sólo 7 positivas por ELISA-*Entamoeba* (sensibilidad = 54%). De las 115 muestras negativas, sólo 5 fueron positivas por ELISA-*Entamoeba* (especificidad = 96%). No se detectó *E. histolytica* en la población estudiada. **CONCLUSIONES:** No hubo una buena correlación entre la identificación microscópica y la prueba de ELISA que identifica *E. histolytica* o *E. dispar*, probablemente debido a una sobreestimación en la identificación morfológica.

Palabras claves: *Entamoeba histolytica*; ELISA; Inmunoensayo; Microscopía.

PREVALENCE OF *E. histolytica* AND *E. dispar* BY MEANS OF MICROSCOPY AND ELISA IN A SUBURB OF LIMA

SUMMARY

OBJECTIVES: To assess the prevalence of *E. histolytica* and *E. dispar* in a marginal population of Callao, Lima, using ELISAs. **MATERIAL AND METHODS:** Two ELISAs were used, one of them for both *Entamoeba* species (*Entamoeba*-ELISA), and an *E. histolytica*-specific ELISA. **RESULTS:** 128 stool samples from randomized Callao inhabitants were microscopically examined. Thirteen (10%) were microscopically diagnosed as having *E. histolytica* or *E. dispar* infection; and 7 (6%) were positive to *Entamoeba*-ELISA (sensitivity = 54%). Five of the 115 samples without cysts of *E. histolytica* or *E. dispar* were *Entamoeba* ELISA positive (specificity = 96%). All samples were negative to the *E. histolytica*-specific ELISA. **CONCLUSIONS:** The correlation between the microscopical identification and *Entamoeba*-ELISA was not good, it may be due to an overvaluation of the morphological diagnosis.

Key words: *Entamoeba histolytica*; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Immunoassay; Microscopy.

Correspondencia:

Biol. William Cornejo Medina
Departamento Académico de Microbiología Médica
Facultad de Medicina. UNMSM.
Av. Grau 755. Lima 1, Perú
E-mail: d100678@ummsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un protozooario patógeno que habita el intestino grueso del hombre, produciendo cuadros digestivos ligeros o graves, como perforación intestinal, abscesos en diferentes órganos (principalmente hígado), y ocasionalmente la muerte. Se estima que anualmente cerca de 500 millones de personas en el mundo se infectan con el parásito, la mayoría de las cuales no experimentan síntomas, existiendo el parásito como un comensal intestinal. Sin embargo, cerca del 10% de los infectados desarrolla la enfermedad, desarrollando algún tipo de sintomatología clínica (1). La razón para esta gran diferencia entre el número de infectados y de enfermos ha sido mejor explicada recientemente. Se ha demostrado que *E. histolytica* involucra en realidad a dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas: una especie patógena para la cual se ha retenido el nombre de *E. histolytica*, y una especie no patógena a la cual se le ha denominado *E. dispar* (2). Estas dos especies han sido diferenciadas por análisis de isoenzimas (3,4), tipificación de antígenos de superficie con anticuerpos monoclonales (5), secuenciamiento del ARN ribosomal (6) y mediante análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (7).

La importancia de distinguir *E. histolytica* y *E. dispar* se debe al hecho que *E. histolytica* es la causa de todos los casos de colitis y abscesos hepáticos, aunque también puede ocasionar una infección asintomática, mientras que *E. dispar* no ocasiona enfermedad ni requiere terapia. La identificación y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces está limitada a observar glóbulos rojos en trofozoítos de *E. histolytica* al examen microscópico, dado que los dos parásitos son idénticos en apariencia. Más aún, la microscopía es de bajo rendimiento cuando los parásitos son escasos y, además, se requiere de un alto grado de entrenamiento para evitar los falsos positivos. El cultivo de los parásitos es un método más sensible que la microscopía (8), y el análisis de isoenzimas de las amebas cultivadas permite la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Sin embargo, ambas técnicas requieren de personal capacitado y de condiciones de laboratorio poco usuales en el diagnóstico clínico en países como el nuestro, además se requieren 1-2 semanas para completar el trabajo.

En el Perú, la prevalencia de amebiosis (o amebiasis), o sea portadores de amebas intestinales con morfología

de *E. histolytica*, varía según las regiones geográficas y distribución de las poblaciones, siendo más prevalente en la Sierra. La amebiosis se ha reportado con más frecuencia en los departamentos de Junín (53%), Cuzco (38,6%), Arequipa (30%) y Puno (16%) (9-12). Para Lima se ha reportado una prevalencia del 3% (13). Estas encuestas coparásitológicas han utilizado la identificación microscópica de quistes o trofozoítos en muestras concentradas o teñidas permanentemente, lo que puede haber dado lugar a una sobreestimación de la real prevalencia de la infección por *E. histolytica*.

Un grupo de expertos sobre amebiasis de la OMS/OPS/UNESCO ha recomendado el desarrollo de mejores métodos para el diagnóstico específico de la infección por *E. histolytica*, poniendo énfasis en el empleo de técnicas apropiadas para los países en desarrollo (2). Dentro de estas técnicas se considera que el ensayo inmunoenzimático para la búsqueda de coproantígenos es la metodología más simple y efectiva para la identificación de individuos infectados con *E. histolytica* (8), teniendo la ventaja de poder ser usada en el campo, así como de contar con los reactivos comerciales.

En nuestro país, la prevalencia de la amebiosis está basada en la identificación microscópica del parásito en las heces, pero debido al bajo rendimiento del método y a la imposibilidad real de distinguir entre *E. histolytica* y *E. dispar*, desconocemos la real prevalencia de la infección por *E. histolytica* en la población peruana. El propósito del presente estudio fue utilizar pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) para estudiar la prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en una población de Lima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

El estudio fue realizado en una localidad urbano marginal de Lima – Callao: el Asentamiento Humano "Tiwinza", durante junio de 1998. El universo estuvo compuesto por 200 familias, de las cuales se tomó una muestra al azar de 128 pobladores, que incluyó niños y adultos de ambos sexos.

Muestras de heces

Las muestras fueron colectadas en recipientes de poliestireno expandible (Teknopor®) con tapa, transpor-

tadas al laboratorio y divididas en dos porciones: una porción fue disuelta en solución salina con formol al 10% y la otra porción fue mantenida a 4°C o a -20°C, sin preservante, y utilizada para la detección de antígeno.

Identificación de los parásitos por microscopía

Se realizó el examen directo de las muestras colocándose una pequeña porción de heces sobre una lámina portaobjetos y se le mezcló con una gota de Lugol. Se utilizó también el método de sedimentación rápida modificado (¹⁴) como técnica de concentración. El sedimento obtenido fue procesado en forma similar al descrito para el examen directo. El criterio de identificación de *E. histolytica* o *E. dispar* fue la detección de quistes que midieran entre 10-20 μm con dos o cuatro núcleos que tuvieran el patrón de cromatina característico (¹⁵). Asimismo, se registró todas las especies de parásitos observados.

Detección de antígeno

La prueba de ELISA *Entamoeba* (TechLab, Blacksburg, Va.), diseñada para detectar pero no diferenciar *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces, fue aplicada al total de las muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante. La prueba de ELISA *E. histolytica* (TechLab, Blacksburg, Va.), que detecta sólo *E. histolytica* en heces, se aplicó a todas las muestras que tuvieran prueba de ELISA *Entamoeba* positiva. Ambas pruebas están basadas en un ELISA de captura de antígeno. La especificidad de las pruebas se debe a que el ELISA *Entamoeba* utiliza anticuerpos que detectan los epítopes comunes de la adhesina (antígeno) de *E. histolytica* y *E. dispar*, y el ELISA *E. histolytica* emplea anticuerpos específicos para los epítopes de la adhesina de *E. histolytica*. La lectura de la prueba se realizó a simple vista dado que la reacción fue de corte claro.

Análisis estadístico

El hallazgo de amebas clasificadas morfológicamente como *E. histolytica* o *E. dispar* utilizando la microscopía de luz se consideró como el "parámetro de oro" (*gold standard*) a comparar. La sensibilidad del ELISA *Entamoeba* fue calculada dividiendo el número de muestras identificadas como positivas por microscopía y ELISA entre el número de muestras positivas sólo por microscopía. La especificidad del

ELISA *Entamoeba* fue calculada dividiendo el número de muestras detectadas como negativas por microscopía y ELISA entre el número de muestras negativas por microscopía.

RESULTADOS

De las 128 muestras de heces estudiadas, trece (10%) fueron positivas por microscopía a *E. histolytica* o *E. dispar*, de las cuales el ELISA *Entamoeba* identificó 7 muestras como positivas (Tabla N° 1), obteniéndose una sensibilidad de 54%. De las 115 muestras que fueron negativas por microscopía, sólo 5 fueron positivas por el ELISA *Entamoeba*, dando una especificidad de 96%. Por otra parte, 2 de las 13 muestras positivas por microscopía tuvieron simultáneamente *E. histolytica* o *E. dispar* y *E. hartmanni*, las cuales fueron negativas al ELISA. Todas las muestras examinadas por ELISA *E. histolytica* fueron negativas.

Tabla N° 1.- Comparación de los resultados obtenidos por microscopía y la prueba de ELISA *Entamoeba* para las mismas muestras fecales.

Resultados del ELISA <i>Entamoeba</i>	Resultados por microscopía	
	Positivos n	Negativos n
Positivos	7	5
Negativos	6	110
Total	13	115

DISCUSIÓN

El examen microscópico de heces de la población estudiada reveló una prevalencia de infección por *Entamoeba* del 10%; sin embargo, debido a que las muestras de heces examinadas no fueron frescas, no fue posible obtener cultivos de ellas y no se pudo confirmar los resultados obtenidos por el examen microscópico. Varios investigadores han revelado que la

microscopía proporciona muchos casos falsos positivos (^{1,8,16,17}). Así, en Bangladesh, de todos los niños con diarrea diagnosticados de amebiosis por microscopía, sólo el 40% de los casos fueron confirmados cuando se emplearon métodos específicos (cultivo y análisis de isoenzimas, y detección de antígeno). Más aún, la mayoría de casos diagnosticados de amebiosis mediante métodos específicos no fueron detectados por la microscopía (¹⁶).

La detección de la adhesina del parásito (antígeno) en heces por el método ELISA *Entamoeba* reveló una prevalencia de 9% en Lima. La prueba tuvo una alta especificidad (96%), aunque no hubo una buena correlación con los casos positivos detectados por microscopía. Esta falta de concordancia puede deberse a los falsos positivos que la identificación microscópica de *E. histolytica* o *E. dispar* puede originar. En un reciente estudio, ninguna de las muestras que fueron positivas por microscopía pero negativas por cultivo fueron reactivas por el ELISA *Entamoeba* para la detección de antígeno (⁸). Sin embargo, la mayoría de las muestras que fueron simultáneamente positivas a la microscopía y al cultivo fueron correctamente identificadas por el ELISA para detección de adhesina (⁸).

Dos de las muestras positivas por microscopía, pero sin demostración de antígeno, tuvieron una simultánea presencia de *E. histolytica*/*E. dispar* y *E. hartmanni*, un hecho que revela la importancia de una adecuada medición de los parásitos (¹⁵), la cual es una metodología sujeta a error.

De gran significado es la ausencia de *E. histolytica* en la población estudiada de Lima - Callao, observación similar a la de otros investigadores, quienes encontraron que la infección simultánea con *E. dispar* y *E. histolytica* es un evento infrecuente (^{18,19}). Esto estaría reflejando que la infección por *E. dispar* es mucho más común que la infección por *E. histolytica* en asintomáticos.

En conclusión, el empleo de técnicas de inmunodiagnóstico (ELISA) para confirmar la presencia de *E. histolytica* debe ensayarse en mayor número de casos. Nuestros resultados preliminares presentados aquí indican su utilidad; por lo cual debería seguirse el siguiente esquema: Todo examen de heces en el que se observe amebas con características morfológicas de *E. histolytica* o *E. dispar* debería ser sometido a una prueba de ELISA *Entamoeba* para confirmar este hallazgo y

aquellas muestras de heces con ambos resultados positivos deberían ser evaluadas con ELISA *E. histolytica* para identificar la infección por *E. histolytica* en heces.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nora Reyes, Dirección de Salud del Callao, al Dr. Milton Salcedo, Médico Jefe del Centro de Salud del Asentamiento Humano Acapulco, y a su personal de salud por la colaboración brindada para la realización del presente trabajo. Trabajo financiado por el Consejo Superior de Investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (Proyecto 80101011, 1998).

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 228-38.
- 2) WHO/PAHO/UNESCO. Report of a consultation of experts on amebiasis. México City, México. 1997. Pág. 1-3.
- 3) Sargeant PG, Williams JE, Grene ID. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-21.
- 4) Sargeant PG, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73: 225-7.
- 5) Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, Mirelman D. Pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990; 58: 1802-6.
- 6) Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 49: 297-302.
- 7) Tannich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 250-5.
- 8) Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2558-61.
- 9) Contreras O, Huiza A, Náquira F. Enteroparasitismo en escolares de la Provincia de Chupaca. Junín. Libro de Resúmenes del II Congreso Peruano de Parasitología. Lima 1985. pág. 18.
- 10) Cárdenas F, Martínez E. Parasitismo intestinal en escolares del nivel primario de la localidad de Espinar - Cuzco. *Bol Per Parasitol* 1997; 12: 10.

- 11) **Náquira C, Córdova E, Espinoza Y, Ruelas N, Nayhua R, Dávila E.** Caracterización morfológica, cultural y bioquímica de las cepas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica*. Informe Final. CONCYTEC. Lima 1996.
- 12) **Monroy R, Turpo P, Luque C.** Parasitismo intestinal en niños menores de 5 años del Programa PANFAR. Azángaro - Puno. Bol Per Parasitol 1997; 12: 12.
- 13) **Náquira C.** Amebiosis. Rev Gastroenterol Perú 1997; 17: S92-S99.
- 14) **Tello R.** Empleo de una nueva técnica parasitológica rápida de sedimentación espontánea en el diagnóstico de protozoarios y helmintos. Simposium Internacional "Parasitismo intestinal en el hombre". Lima. 9-10 Setiembre 1988.
- 15) **Gonzales-Ruiz A, Bendall RP.** Size matters: the use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. Parasitol Today 1995; 11: 83-5.
- 16) **Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, Petri WA Jr.** *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997; 175: 734-6.
- 17) **Krogstad DJ, Spencer HC, Healy GR, Gleason NN, Sexton DJ, Herrón CA.** Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. Annals of Internal Medicine 1978; 88: 89-97.
- 18) **Britten D, Wilson SM, Mc Nerney R, Moody AH, Chiodini PL, Ackers JP.** An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. J Clin Microbiol 1997; 35: 1108-11.
- 19) **Haque R, Ali JK, Akther S, Petri WA Jr.** Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36: 449-52.