

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

## ENZYMEBA, PROCEDIMIENTO EFICAZ PARA ESTUDIAR LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN INTESTINAL POR ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

Dr. Luis Fonte Galindo,<sup>1</sup> Dr. Fidel Núñez Fernández,<sup>1</sup> Lic. Ana Margarita Montalvo,<sup>2</sup> Dra. Lázara Rojas Rivero<sup>1</sup> y Dr. Esteban Alberti Amador<sup>3</sup>

### RESUMEN

Por la utilidad epidemiológica que tiene el desarrollo de procedimientos que permitan estudios confiables de prevalencia de amebiasis intestinal se estudió la eficacia de ENZYMEBA, ensayo inmunoenzimático para la detección en heces de *Entamoeba histolytica*. ENZYMEBA, mediante el empleo de una sola muestra por individuo participante en el estudio, demostró infección por *E. histolytica* en 27 de los 686 casos estudiados. La observación microscópica de heces sólo igualó los resultados de ENZYMEBA cuando fueron analizados los resultados de ambos procedimientos sobre 3 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 inmunoensayo realizable en condiciones mínimas de laboratorio, consideramos que ENZYMEBA es una herramienta muy útil para estudios de prevalencia de amebiasis intestinal.

*Descriptor deCS:* DISENTERIA AMEBIANA/diagnóstico; DISENTERIA AMEBIANA/epidemiología; ENTAMOEBIA HISTOLYTICA/enzimología; TECNICAS PARA INMUNOENZIMAS; HECES.

La amebiasis es la infección del hombre por *Entamoeba histolytica*.<sup>1</sup> Se han descrito formas patógenas y no patógenas de este protozoo.<sup>2</sup> En fecha reciente, ha sido sugerido que *E. histolytica* es un complejo de 2 especies con diferentes grados de patogenicidad.<sup>3</sup> La detección de *E.*

*histolytica* en heces se ha basado tradicionalmente en el hallazgo de los quistes y/o trofozoítos correspondientes en el examen microscópico de la materia fecal. Sin embargo, este procedimiento posee importantes limitaciones, entre otras: la excreción de quistes es intermitente, por lo que se

<sup>1</sup> Investigador Auxiliar.

<sup>2</sup> Licenciada en Biología. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Investigador Agregado.

requiere de al menos 3 exámenes en días sucesivos para detectar el 90 % o más de los casos;<sup>4</sup> con frecuencia otras células en heces, en particular leucocitos, son identificadas por error como quistes de *E. histolytica*.<sup>5</sup>

La mayoría de los reportes sobre prevalencia de amebiosis intestinal ofrece, en el mejor de los casos, resultados aproximados, debido a que han sido realizados en grupos seleccionados, tales como hospitalizados que por algún motivo han requerido asistencia médica.<sup>6</sup> Las prevalencias verdaderas que deben derivarse de la búsqueda en poblaciones no seleccionadas, no son conocidas. A ello se agrega que estos estudios fueron realizados con el empleo de la observación microscópica de 1 sola muestra de heces como herramienta para detectar la infección y ello se asocia, como expresáramos antes, a subdiagnóstico de amebiosis.

En 1988, *Luaces y Barret*<sup>7</sup> describieron una proteasa de *E. histolytica* a la que denominaron histolisina. Más tarde, *Luaces* y otros<sup>8</sup> desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (ENZYMEBA) para la detección de esta enzima (renombrada histolisina a partir de este trabajo) en heces. En Cuba, la eficacia diagnóstica de este procedimiento fue probada en un estudio de validación realizado en Ciudad de La Habana.<sup>9</sup>

Teniendo en cuenta las bondades de ENZYMEBA, en especial que sus altos índices de sensibilidad y especificidad no dependen de la subjetividad de un observador, y el hecho de que por estar basado en la detección de la actividad enzimática de la histolisina excretada, es posible un resultado positivo en ausencia de parásitos intactos (quistes y/o trofozoítos) en las heces observadas, decidimos estudiar la factibilidad de su empleo en estudios de prevalencia.

## MÉTODOS

### MUESTRAS DE HECES

Se colectaron muestras seriadas de heces (hasta 3 por individuo) de 404 estudiantes y 282 personas relacionadas (profesores, personal no docente y familiares de ambos grupos) de 2 escuelas de enseñanza media de Ciudad de La Habana.

### EXAMEN MICROSCÓPICO DE LAS HECES

A cada muestra se le realizó examen microscópico directo mediante coloración con eosina y lugol; además, se concentró una porción de ésta por el método de Ritchie.<sup>10</sup>

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de histolisina, proteasa excretada por *E. histolytica* (ENZYMEBA)

Con la intención de detectar la presencia de *E. histolytica* en cada una de las 3 muestras de heces de cada individuo participante en el estudio, se realizó ENZYMEBA, procedimiento para la detección de este protozoo en las heces.

ENZYMEBA se efectuó según reportaron *Luaces y otros* en 1992,<sup>8</sup> con algunas modificaciones. Fueron sensibilizadas placas de poliestireno de fondo plano y de 96 pocillos (Marxisorp NUNC) durante 16 h a 4°C con 125 mL/pocillo de una solución 0,1 M de carbonato de sodio pH 9,6 y contentiva de anticuerpos antihistolisina obtenidos en conejo (5 mg/mL). Los sitios no recubiertos por el anticuerpo fueron bloqueados durante 2 h a 37°C con 150 mL/mL de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1 %. Transcurrida esta incubación, se eliminó el agente bloqueante y se añadieron las muestras de heces previamente diluidas en agua destilada (1 g de heces en 3 mL de agua destilada).

Después de 4 h en contacto con la placa a 4°C el material no "capturado" fue desechado y tras 4 lavados con TWEEN-20

al 0,05 % en PBS (PBS-T), fueron colocados en los pocillos 100 mL de 100 mM Benziloxycarbonil-L Arginil-L Arginine 2-(4-metoxi) naphthylamida (z-arg-arg Mna) Bachen (Suiza), en solución 50 mM glicina-EDTA pH 9,5 que contenía, además, L-cysteina 2 mM.

Luego de 16 h de incubación a 37°C, la acción de la enzima capturada fue revelada mediante la adición de 100 mg/uL de una solución que contenía p-cloro mercuribenzoato 5 mM, Fast garnet 22,5mg/mL, 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 continuó amarillo. En cada ensayo se utilizaron 2 controles (positivo y negativo).

De manera adicional, se realizó la lectura espectrofotométrica del contenido de la columna líquida de cada pocillo. Para ello se empleó un lector de inmunoensayo a 520 nm (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, Mclean, Va). El valor de corte del inmunoensayo ENZYMEBA fue determinado mediante la suma de la media de las densidades ópticas (DO) de los 659 casos negativos por observación microscópica de heces, más 2 desviaciones estándar.

## TRATAMIENTO

Ninguna de las personas positivas a *E. histolytica* presentaban síntomas ni signos clínicos atribuibles a amebiosis intestinal y, por ello, fueron tratados con furoato de diloxanida, un amebicida luminal libre de serios efectos colaterales.<sup>11</sup> La dosis suministrada fue de 500 mg 3 veces al día durante 10 d.

## ESTUDIOS POSTRATAMIENTO

Comenzando al séptimo día postratamiento se recogieron 3 muestras de heces en días alternos de cada individuo tratado. La primera muestra fue examinada por microscopia y por ENZYMEBA y las otras 2 sólo por microscopia.

## RESULTADOS

De las 686 personas que participaron en el estudio, en 27 se detectó por observación microscópica y por ENZYMEBA la presencia de *E. histolytica* (tabla 1). Sin embargo, todos los casos positivos lo fueron por ENZYMEBA desde la primera muestra, no ocurrió así con la observación microscópica, pues con ésta el número de casos positivos se acercó e igualó el de ENZYMEBA en la medida en que aumentó el número de muestras por individuo involucrado en el estudio (15 lo fueron en la primera muestra; 7 y 5 resultaron positivos por primera vez en la segunda y tercera muestras, respectivamente).

Tabla 1. Resultados de ENZYMEBA y de la observación microscópica realizados a 3 muestras de heces de cada participante (686 individuos) en días alternos

		ENZYMEBA*		
		Positivos	Negativos	Totales
Examen microscópico**	Positivos	27	0	27
	Negativos	0	659	659
Totales		27	659	686

\* Todos los positivos lo fueron en las 3 muestras.

\*\* De los positivos, 15, 7 y 5 lo resultaron por primera vez en la 1ra., la 2da. y la 3era. muestras, respectivamente.

A los efectos de verificar si los resultados que estábamos obteniendo por ambos métodos eran correctos, a los 27 individuos positivos se les trató con furoato de diloxanida y la infección, como puede observarse en la tabla 2, fue eliminada en todos ellos. Esto

fue comprobado tanto por microscopia como por ENZYMEBA. En el caso de esta última prueba, y como también puede observarse en la tabla 2, todos los valores de DO obtenidos caen por debajo del valor de corte después del tratamiento.

Tabla 2. Resultados de ENZYMEBA y de la observación microscópica de heces (antes y después del tratamiento) en individuos infectados con *Entamoeba histolytica* y tratados con furoato de diloxanida

Microscopia		ENZYMEBA	
Presencia de quistes		Valores de densidad óptica (DO)*	
Pretratamiento	Posttratamiento	Pretratamiento	Posttratamiento
+	-	1,172	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	0,275
+	-	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 menor que 0,824 (valor de corte) fue considerado un resultado negativo por ENZYMEBA.

## DISCUSIÓN

Las cifras de prevalencia de infección intestinal por *E. histolytica* varían considerablemente de un área geográfica a otra. Ello obedece, además de a diferentes condiciones climatológicas e higiénico-sanitarias, a los métodos de detección utilizados en cada estudio y, en el caso de la observación microscópica de las heces, al número de muestras tomadas a cada individuo encuestado.<sup>5</sup>

ENZYMEBA detecta una proteinasa excretada por cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica* con independencia de la presencia en la muestra problema de quistes y/o trofozoítos de este protozoo.<sup>7</sup> Nuestro trabajo demuestra que, a diferencia del examen microscópico de heces, con ENZYMEBA es suficiente el estudio de 1 muestra por individuo para conocer si está infectado por *E. histolytica*.

En este estudio, los resultados de ENZYMEBA coincidieron con los de la observación microscópica de heces cuando ésta se realizó a 3 muestras por individuo.

La objetividad de estos resultados se demostró con la negativización de és-

tos tras el tratamiento amebicida correspondiente. En nuestra casuística se empleó furoato de diloxanida, un amebicida luminal, por 2 razones, ninguno de los individuos tenía síntomas clínicos y la presencia "portador asintomático", asociada a zimodemos no patógenos, parece ser la forma más común de la amebiosis intestinal en Cuba.<sup>12</sup> ENZYMEBA 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 cuando la hidrólisis no tiene lugar. Esta ventaja de ENZYMEBA permite su utilización en condiciones mínimas de laboratorio, pues no requiere el uso obligatorio de un lector de ELISA.

Las ventajas de ENZYMEBA a que hemos hecho referencia, en particular su sensibilidad, que emplea sólo 1 muestra por individuo y que no requiere, a diferencia de otros ensayos inmunoenzimáticos, de un lector de ELISA, hacen de este procedimiento una herramienta muy útil en estudios de prevalencia de amebiosis intestinal.

## SUMMARY

Owing to the epidemiological usefulness of the development of methods allowing reliable studies on the prevalence of intestinal amebiasis, this paper studied the effectiveness of ENZYMEBA, immuno-enzymatic assay to detect *Entamoeba histolytica* from feces. Through only one feces specimen from every participant in the study, this assay detected *E. histolytica* infection in 27 out of the 686 cases observed. The results of microscopic feces observation were only comparable to those of ENZYMEBA when the result of both methods were carefully examined in 3 feces specimen taken from each of the subjects participating in it. Because this immunoassay is highly sensitive, requires only one feces specimen per surveyed person and can be performed at a minimal laboratory conditions, ENZYMEBA is considered to be a very useful tool for studying the prevalence of intestinal amebiasis.

*Subject headings:* DYSENTERY AMEBIC/diagnosis; DYSENTERY AMEBIC/epidemiology; ENTAMOEBIA HISTOLYTICA/enzymology; INMUNOENZYME TECHNIQUES; FECES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am Trop Med Hyg* 1994;51:115-8.
2. Sargeant PG, Williams JE. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:519-21.
3. Diamond LS, Clark IA. Redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 1993;40: 340-44.
4. 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.
5. Bruckner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:356-69.
6. Chacin-Bonilla E, Parra AM, Estévez J, Morales LM, Suárez H. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites in a community from Maracaibo, Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86:373-80.
7. Luaces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1988;250:903-9.
8. \_\_\_\_\_. The ENZYMEBA test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immuno-enzymatic detection of histolysin. *Parasitology* 1992;105:203-5.
9. Fonte L, Núñez F, Montalvo AM, Rojas L, Galloso M, Ginorio D, et al. Validación en Ciudad de La Habana, Cuba, de ENZYMEBA, inmunoensayo para la detección en heces de *Entamoeba histolytica*. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(1):(en prensa).
10. Ash LR, Orihel TC. *Parasites: a guide to laboratory procedures and identification*. Chicago: ASCP, 1987:18-26.
11. Organización Mundial de la Salud. Grupo Científico de Trabajo. Infecciones intestinales por Protozoos y Helminetos. Informe de un Grupo Científico de la OMS. Ginebra:OMS, 1981:117-8 (Serie de Informes Técnicos;666).
12. Mendiola J, Peláez E, Carballo D, Rabasa D. Caracterización isoenzimática de cepas de *Entamoeba histolytica* aisladas de pacientes cubanos y extranjeros procedentes de África. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43:85-9.

Recibido: 26 de junio de 1997. Aprobado: 9 de septiembre de 1997.

Dr. *Luis Fonte Galindo*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.