



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL  
 METODO MORFOLOGICO Y UN NUEVO  
 METODO INMUNOENZIMATICO PARA  
 DETECCIÓN DE Entamoeba histolytica EN HECES



EXAMENES PROFESIONALES  
 FAC. DE QUIMICA

# TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
 QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
 P R E S E N T A N :  
 SILVIA LAURA NAJERA SANCHEZ  
 LORENA PEREZ SANCHEZ

México, D. F.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

1994



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

Presidente: Prof. Saturnino de León Chapa  
Vocal: Prof. Abel Gutiérrez Ramos  
Secretario: Prof. Maité Astigarraga Zavaleta  
1er. Suplente: Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz  
2do. Suplente: Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís

## SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Grupo Médico y de Asistencia, S.A. de C.V. (MEDASIST)

## NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA

Prof. Abel Gutiérrez Ramos



---

## NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUPERVISOR TECNICO

Dr. Alvaro Sosa Verduzco



---

## NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DE LAS SUSTENTANTES

Silvia Laura Nájera Sánchez



---

Lorena Pérez Sánchez



---

## **A DIOS**

Por esa energía divina  
que en todo momento  
me ha acompañado, aún  
en los momentos que he  
creído estar sola.

## **A DIANA**

Por ser la razón de mi vida,  
la motivación que necesito para ser  
mejor cada día y la esperanza  
para cumplir todos mis sueños

**TE QUIERO  
HASTA LA LUNA, EL SOL,  
LAS ESTRELLAS, LOS PLANETAS  
Y TODO EL UNIVERSO  
IDA Y VUELTA Y DE REGRESO  
PORQUE TE AMO CON TODO MI CORAZON.**

## **A MIS PADRES**

Por darme la vida y  
entregarme su amor incondicional  
que me ha acompañado siempre  
dandome la fuerza necesaria  
para vencer toda adversidad.  
Por su comprensión, apoyo,  
amistad e interés,  
por compartir mis logros como propios  
y por los sentimientos que con  
palabras no puedo expresar.

**CON ETERNO AMOR**

**LAURA**

**A RAFAEL**

Porque con tu actitud  
me mostraste el camino a seguir  
y a no desistir en mis ideales

**CON AMOR**

**LAURA**

## **A MIS HERMANOS**

### **ADRIAN**

Por tu apoyo y comprensión,  
por ser mi compañero de infancia  
y por aquellos recuerdos que solo  
son nuestros

### **VERONICA**

Por tu ayuda incondicional  
y paciencia al ser que más  
quiero, demostrándome tu  
cariño infinito

### **CON TODO MI AMOR**

**LAURA**

## **A MIS ABUELITOS**

Ma. de la Paz y Víctor  
Por sus bendiciones, apoyo  
y confianza que me han  
brindado desde siempre

A las familias Nájera Rodríguez y Sánchez Bermúdez,  
con cariño

## **A MIS AMIGOS**

Mercedes y Leopoldo  
Miriam y Rosendo  
Germán Leguel Del Vado  
Magdalena López de Alcaráz

Por su atención, comprensión,  
apoyo y confianza.

## **A DIOS**

Por regalarme la fantástica aventura de la vida  
por permitirme formar parte de la vida de los  
que amo y que me aman  
por brindarme el maravilloso don de la maternidad

## **A MIS PADRES**

Por todo el amoroso sacrificio  
que me dedicaron desde que mi existencia  
era una ilusión, hasta hoy,  
para lograr uno de sus más hermosos sueños  
y uno de mis más grandes anhelos

### **A MI PADRE**

Por su siempre valioso  
y sabio consejo  
por su ejemplo de entrega,  
perseverancia y dedicación  
en cada oportunidad  
que la vida le ha ofrecido

### **A MI MADRE**

Muy en especial  
por la inquebrantable fe  
y el eterno apoyo que me  
profesó en todo momento  
para lograr en armonioso equilibrio  
la culminación de mis estudios

## **A ERICK**

Por ser la razón de mi existencia  
y mi motivación más profunda para  
seguir superándome

## **A LA VIDA NUEVA**

Que late dentro de mi ser  
que me colma de dicha y esperanza  
y me motiva aún más para ser cada día mejor

## **A ALEJANDRO**

Compañero de mi vida, mi mejor amigo  
por su paciencia y comprensión

### **A ANDREA**

Mi querida hermana  
siempre mi amiga  
por todo el cariño  
que me regala al amar a Erick

### **A NACHO**

Mi pequeño hermano  
con todo el cariño  
que desde niños  
nos ha unido de  
manera muy especial

### **A MAGUITO**

Más que mi adorable tía  
más que la hermana de mi madre  
mucho más..  
por el inmenso amor  
que abnegadamente nos ha  
dedicado desde siempre

### **A SANDRA**

(Mucho más que la madre  
de mi compañero)  
por su respaldo y ayuda  
siempre incondicionales

### **A LOLITA**

Porque aún sin merecerlo  
me honra con su cariño  
y me brinda siempre su  
apoyo incondicional

### **A CRIS**

Mi mejor amiga  
compañera de momentos inolvidables

## AGRADECIMIENTOS

- M. en C. Felipe Cruz García, por la dedicación y orientación a este trabajo, con afecto.
  - Arq. Leopoldo Ramos San Martín, por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.
  - Q.F.B. Luz María Tachiquin, por la oportunidad brindada.
  - Dr. Alvaro Sosa Verduzco, por su apoyo.
  - Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos, por su apoyo y asesoría.
  - Q.F.B. Saturnino de León Chapa, por su asesoría.
  - Dr. Luis Fonte Galindo, por su apoyo y asesoría en la parte inicial de este trabajo.
  - Dr. Juan José Pérez Gómez, por permitir la realización de este trabajo.
- U.M.F. No. 1, 10, 15, 21, 46 y 78, por su cooperación.
- H.R. Adolfo López M. y H.R. 20 de Nov., por su cooperación.
  - Q.F.B. José Juan Zúñiga Aguilar, con especial afecto.
  - Q.F.B. Elpidio García Ramírez, por su valiosa amistad.
  - Sr. Macario Armendáriz Martínez (MEDASIST).
  - Ing. Jaime Pinzón Mendoza, por su colaboración.
  - A todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo.

# INDICE

INDICE DE FIGURAS.	iii
INDICE DE CUADROS.	iv
INDICE DE CUADROS DEL APENDICE.	v
RESUMEN.	vi
INTRODUCCION.	1
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	4
I. GENERALIDADES.	5
1. Generalidades del Parásito.	5
1.1. Clasificación de <i>E. histolytica</i> .	5
1.2. Morfología de <i>E. histolytica</i> .	5
1.3. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .	7
1.4. Patogenicidad de la amibiasis.	9
a. Patogenicidad de <i>E. histolytica</i> .	9
b. Posibles factores que intervienen en la patogenicidad.	10
c. Virulencia de <i>E. histolytica</i> .	12
d. Papel de las bacterias.	13

e. Susceptibilidad y Resistencia del hospedero.	14
1.5. Cuadro clínico de la amibiasis.	15
2. Epidemiología de la amibiasis.	18
3. Métodos de Diagnóstico.	24
3.1. Técnicas Coproparasitoscópicas o Directas.	25
Método de Faust.	28
3.2. Técnicas Serológicas o Indirectas. Método ENZYMEBA.	30 32
II. MATERIALES Y METODOS.	35
1. Material biológico.	35
2. Procedimiento del Método ENZYMEBA.	36
3. Análisis Estadístico.	38
III. RESULTADOS Y DISCUSION.	39
IV. CONCLUSIONES.	48
V. APENDICES.	49
VI. BIBLIOGRAFIA.	53

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAG.
1. Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
2. Porcentaje de detección de <i>E. histolytica</i> detectada por el método CPS y de ENZYMEBA.	40
3. Comparación por clínica de la incidencia de <i>E. histolytica</i> en heces por los métodos CPS y ENZYMEBA.	44

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAG.
1. Marcadores como posibles factores que intervienen en la patogenia de la amibiasis.	10
2. Mecanismos de Agresión como posibles factores que intervienen en la patogenia de la amibiasis	11
3. Prevalencia global e Indice de la amibiasis.	18
4. Comparación de las técnicas coproparasitoscópicas (CPS) y ENZYMEBA.	42
5. Incidencia de infección por <i>E. histolytica</i> utilizando el método ENZYMEBA, según la zona y condición socioeconómica en el D.F. y zona conurbada.	46

## INDICE DE APENDICES

APENDICE	PAG.
1. Material, Reactivos y Soluciones proporcionados en el juego de reactivos ENZYMEBA.	49
2. Preparación de Reactivos Intermediarios:	51
a. Controles.	
b. Amortiguador para lavados.	
c. Activador.	
d. Activador - Sustrato.	
e. Reactivo 7-8-9.	
f. Reactivo de Color.	
3. Tabla de Análisis de Varianza de la Comparación entre el método coproparasitoscópico (CPS) y ENZYMEBA para la detección de <i>Entamoeba histolytica</i> en heces.	52

## RESUMEN

La amibiasis es una infección intestinal causada por *Entamoeba histolytica*, siendo un problema de salud pública por su frecuencia, morbilidad y mortalidad, encontrándose la mayor presencia e incidencia de la infección en comunidades con condiciones socioeconómicas deficientes, donde la sanidad ambiental y alimentación son inadecuadas. Por otra parte, la frecuencia de amibiasis intestinal detectada por métodos convencionales no es un índice confiable para determinar la presencia de la enfermedad amibiana, debido a la dificultad para establecer un diagnóstico de certeza, que permita dar valor a estudios epidemiológicos.

De acuerdo con lo anterior en este estudio se evaluó un método inmunológico (ENZYMEBA) para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces y se comparó con un método convencional (CPS).

A un total de 799 muestras de heces obtenidas al azar fueron analizadas por el método coproparasitológico de Faust y posteriormente se les aplicó el método ENZYMEBA. Los resultados obtenidos por ambos métodos (CPS Y ENZYMEBA), fueron analizados por medio de un análisis de varianza por el cual se determinó el efecto de los métodos y el diagnóstico (positivo y negativo) sobre la presencia de *Entamoeba histolytica* en las muestras.

Los resultados mostraron que el método CPS y ENZYMEBA presentaron diferencias significativas en cuanto al diagnóstico de casos positivos y negativos, siendo el método CPS el que diagnosticó más casos positivos que el método ENZYMEBA, mientras que en relación al diagnóstico de casos negativos, el método ENZYMEBA determinó mayor número de éstos que el método coproparasitológico (CPS). De acuerdo con lo anterior

se llegó a la conclusión de que ENZYMEBA puede ser utilizado como un método alternativo para el diagnóstico de certeza de amibiasis intestinal; dadas sus características, ofrece mayores ventajas respecto al método coproparasitológico en cuanto a la determinación de casos positivos y negativos para *Entamoeba histolytica*.

## INTRODUCCION.

La amibiasis es una infección intestinal causada por *Entamoeba histolytica*; probablemente esta enfermedad ha existido desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución, lo cual trajo como consecuencia un aumento considerable en la incidencia y distribución mundial de la amibiasis<sup>24</sup>.

*Entamoeba histolytica* es un organismo eucariótico pequeño (10-40  $\mu$ m), frágil, sensible a cambios ligeros de temperatura, capaz de colonizar el intestino grueso. Además en circunstancias aun desconocidas, puede invadir la mucosa intestinal y eventualmente destruir prácticamente cualquier tejido del organismo humano, desde los epitelios de recubrimientos hasta órganos sólidos y huesos. Al mismo tiempo, el parásito evade con éxito las respuestas de defensa moleculares y celulares del huésped humano<sup>24</sup>.

Aproximadamente, el 10% de la población mundial esta infectada por *Entamoeba histolytica*, de ésta del 2 al 30% de los individuos infectados, dependiendo de la virulencia de las cepas en cada área geográfica, desarrollan amibiasis sintomática<sup>38</sup>. Asimismo, estudios recientes indican que alrededor de 60,000 personas mueren anualmente por esta parasitosis<sup>38</sup>.

La identificación microscópica de *Entamoeba histolytica* en heces, sigue siendo hoy día, el método más utilizado para el diagnóstico de amibiasis intestinal, existiendo para ello gran variedad de técnicas coproparasitológicas cada una con una sensibilidad muy diversa; sin embargo, la aplicación del método morfológico a través de la técnica de concentración y flotación de Faust, es la más utilizada en instituciones médicas del país, ya que por tradición resulta ser el método más accesible para cualquier laboratorio, añadiendo que la interpretación de resultados tiene importantes limitaciones por lo cual es frecuente cometer

errores de diagnóstico que generalmente son de sobrediagnóstico, además de inducir a resultados falsos negativos en casos de amibiasis invasora.

Existen algunos métodos alternativos que ofrecen mayor confiabilidad en el diagnóstico de amibiasis extraintestinal como es el caso de los inmunológicos (ELISA, IFI) que detectan anticuerpos séricos contra *Entamoeba histolytica*, los cuales han sido utilizados en el diagnóstico indirecto de absceso hepático amibiano; sin embargo, para la amibiasis intestinal no se ha encontrado una solución eficiente para el problema de su diagnóstico mediante métodos inmunológicos, aunque se ha reportado la detección de antígenos de *Entamoeba histolytica* en heces empleando anticuerpos monoclonales por medio de inmunoensayo, lo cual no ha tenido los resultados esperados debido a reacciones cruzadas con determinantes antigénicas de otros parásitos<sup>12,37</sup>.

Así, quedan establecidas las circunstancias que sirvieron de antecedente a un grupo de investigadores del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), que en los últimos años desarrollaron un nuevo método para el diagnóstico de amibiasis intestinal.

A este procedimiento se le denominó **ENZYMEBA**, el cual se basa en la detección cualitativa de histolisina, una proteasa sintetizada por *Entamoeba histolytica*, que señala su presencia en la muestra problema (heces).

El método **ENZYMEBA** tiene una sensibilidad del 95 al 98 % y una especificidad del 98 al 100 % (18,27, datos no publicados) cuando se le compara con el examen microscópico para heces. Debido a que este método está basado en la actividad de una proteasa específica de *Entamoeba histolytica*, no existe la posibilidad de fallos en diagnóstico provocados por la destrucción del parásito en muestras recogidas o preservadas inadecuadamente o por confusión con otros artefactos, como en el caso de la observación

microscópica; además no se producen reacciones cruzadas cuando la muestra que se procesa contiene otros parásitos.

Por lo tanto, la amibiasis es un problema de salud pública, que requiere de un método que proporcione un diagnóstico de certeza real y de esta forma poder obtener mayor información de los factores de riesgo de desarrollo de la infección y de la enfermedad amibiana, así como la incidencia de la misma.

Por esta razón, se considera importante la realización de un estudio comparativo de dos técnicas, la coproparasitoscópica (Mét. de Faust) y la de **ENZYMEBA**, para evaluar a **ENZYMEBA** como un método alternativo que proporcione un diagnóstico de certeza real para la amibiasis invasora intestinal.

## HIPOTESIS

ENZYMEBA es un método inmunoenzimático para la detección de histolisina, una proteasa específica producida por *Entamoeba histolytica*, la cual señala la presencia del parásito en la muestra problema (heces). Por lo tanto se espera que las muestras analizadas por el método ENZYMEBA presenten diferencias en el número de pacientes diagnosticados con amibiasis comparado con el método coproparasitológico (CPS) de Faust, un método menos específico y empírico para la detección de *Entamoeba histolytica*.

## OBJETIVOS

- a) Determinar la presencia de *Entamoeba histolytica* en heces mediante un método inmunoenzimático "ENZYMEBA".
- b) Comparar y evaluar el valor diagnóstico del método "ENZYMEBA" con el método coproparasitológico (CPS).

# I. GENERALIDADES

## 1. Generalidades del parásito

### 1.1. Clasificación de *Entamoeba histolytica*<sup>17</sup>

Reino	Animalia
Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcodina
Clase	Lobosea
Orden	Amoebida
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

### 1.2. Morfología de *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* presenta tres estadios morfológicos principales: trofozoito (forma móvil o vegetativa), prequiste y quiste (los dos últimos inmóviles)<sup>36</sup>.

El trofozoito es una célula cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con forma variable y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos digitiformes largos, anchos y rápidos. El núcleo es esférico y no se observa fácilmente, ya que ocupa el 20% del volumen de la célula. Los trofozoitos no se enquistan cuando invaden tejido, solo cuando se establecen en la luz intestinal<sup>36</sup>.

El prequiste se forma cuando las condiciones en que se mueve el trofozoíto en el intestino grueso son poco favorables para su supervivencia, empieza a inmovilizarse, perdiendo todo el material intracitoplásmico que no ha digerido. Se redondea, se reviste de una doble membrana gruesa y refringente, la cual le confiere resistencia al parásito cuando se exponga a las condiciones del medio externo al ser expulsado con las materias fecales. En este momento el prequiste presenta en su citoplasma un núcleo y barras cromatoidales y además presenta una pared quística, que lo diferencia del trofozoíto<sup>36</sup>.

Por último, el quiste es la forma infectante de *Entamoeba histolytica*, éstos son redondeados o ligeramente ovalados, su diámetro varía de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Durante la maduración del prequiste se observa que el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del proceso, el quiste maduro que tiene cuatro núcleos pequeños. De cada quiste emerge una sola amiba metaquistica tetranucleada, que produce a su vez ocho trofozoitos uninucleados después de la división<sup>24</sup>. Los quistes se encuentran en las materias fecales sólidas, las cuales, al salir contaminan alimentos, que cuando son ingeridos se adquiere la infección.

### 1.3. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*

El hombre mismo es la fuente de infección y diseminación de *Entamoeba histolytica*, por lo que uno de los aspectos más importantes en la amibiasis son los mecanismos de transmisión como <sup>36</sup>:

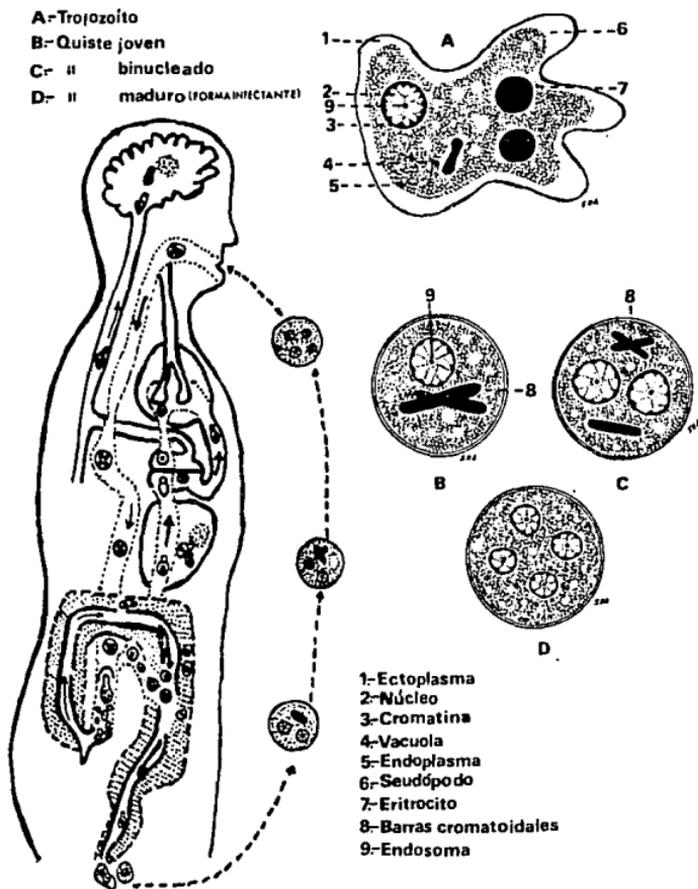
- a) De persona a persona, principalmente por comida o bebidas contaminadas;
- b) Por el fecalismo al aire libre, y
- c) La coprofagia humana.

En la mayoría de los casos la transmisión es debida a la prevalencia de portadores asintomáticos, el cual es un indicador de la magnitud de la infección en una población dada<sup>24</sup>.

La vía de entrada en el organismo es la digestiva, por medio de algún vehículo contaminado con quistes como alimentos, agua y aire; la vía de salida es con la materia fecal, donde el quiste puede perdurar largo tiempo en el ambiente.

Cuando se adquiere la infección al ingerir los quistes de *Entamoeba histolytica*, estos pasan al estómago en donde la acción del jugo gástrico empieza a actuar sobre ellos, pasan al intestino delgado en donde se abren para dejar salir un trofozoito octanucleado, que rápidamente se divide y da lugar a ocho trofozoitos metaquisticos pequeños, los cuales son llevados con el contenido intestinal al ciego en donde pueden seguir dos caminos: establecerse o bien ser arrastrados hasta el exterior junto con la materia fecal; para que los trofozoitos se establezcan en el intestino grueso, tienen que conjuntarse factores tales como: el número de trofozoitos, tránsito intestinal lento, bacterias entéricas apropiadas, dieta rica

en azúcares, potencial de oxido-reducción bajo y otros más (Fig. 1)<sup>36</sup>. Si la amiba se establece en el hospedero, el periodo de incubación biológico es de 1 a 5 días, aunque el tiempo en que se presente la sintomatología puede variar entre 4 días a un año, con un promedio aproximado de 4 meses<sup>36</sup>.



#### 1.4. Patogenicidad de la amibiasis

Para que los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* tengan la capacidad de agredir a los tejidos deberá tener además de los factores arriba mencionados, la presencia de carga enzimática poderosa como por ejemplo de: mucinasa, gelatinasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, glutaminasa, hialuronidasa, caseasa, etc<sup>24, 36</sup>.

Con los factores antes mencionados a favor de las amibas, éstas se podrán establecer en el epitelio intestinal, dividirse por fisión binaria y permanecer en este lugar sin agredir la mucosa intestinal, ya que para que esto suceda entra en juego el factor de patogenicidad de la cepa en particular<sup>24</sup>.

La palabra patogenia involucra los mecanismos participantes en la iniciación, evolución y resultado final del proceso patológico. Tales mecanismos no están, obviamente, limitados al huésped o al parásito, sino que corresponden a ambos, y su expresión conjunta es el proceso patológico. Los mecanismos que participan en la patogenia de la amibiasis humana pueden considerarse bajo cuatro rubros: patogenicidad y virulencia de *Entamoeba histolytica*, el papel de las bacterias, y susceptibilidad y resistencia del hospedero<sup>24, 36</sup>.

##### a. PATOGENICIDAD DE *Entamoeba histolytica*

###### Mecanismos de patogenicidad

Generalmente se acepta que existen cepas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica*. De hecho, la mayoría de las personas infectadas con amibas son portadoras sanas de estos protozoarios. Sin embargo no existen diferencias microscópicas o

ultraestructurales entre las cepas de amibas patógenas y no patógenas. Por esta razón, varios grupos de investigadores han explorado otras características de *Entamoeba histolytica*, que pudieran correlacionarse con el comportamiento biológico de las distintas cepas de amibas<sup>24</sup>. Tales características pueden dividirse en dos categorías: los "marcadores" de la patogenicidad y los "mecanismos agresivos" del parásito (Ver Cuadros 1 y 2).

**b. Posibles factores que intervienen en la patogenicidad de la amibiasis**

**Cuadro 1. MARCADORES**

<b>MARCADORES</b>
Producción de abscesos hepáticos
Aglutinación por concanavalina A
Adherencia a células epiteliales y a glóbulos rojos
Fagocitosis de células epiteliales y de glóbulos rojos
Zimodemos tipos II, VI, VII, X, XI, XII y XIV

**Cuadro 2. MECANISMOS DE AGRESION**

MECANISMOS DE AGRESION	
MEMBRANOSOS	SOLUBLES
Lisomasas de superficie Colagenasa	$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa
Proteína formadora de canales iónicos o amiboporo	Factores inhibidores de la quimiotaxis  Citotoxinas intracelulares

La diferencia entre estos dos grupos de propiedades biológicas de *Entamoeba histolytica* es simplemente que la función de los "marcadores" se desconoce en la actualidad, aunque no se descarta su posible papel como "mecanismos de agresión". También debe subrayarse que la expresión "mecanismos de agresión" se refiere a los que el parásito utiliza de tal manera en modelos experimentales *in vitro* muy simplificados y artificiales. Se ignora si tales mecanismos de agresión desempeñan algún papel en la amibiasis humana<sup>24</sup>.

### c. Virulencia de *Entamoeba histolytica*

#### Mecanismos de Virulencia

La gravedad del padecimiento causado por cepas patógenas de *Entamoeba histolytica* es variable, aunque no se han creado métodos uniformes de cuantificación. Tales variaciones dependen tanto del parásito como del hospedero. Si la patogenicidad está necesariamente ligada a uno o más mecanismos de agresión, la virulencia debe depender de su modulación. La virulencia se determina por el número de abscesos hepáticos producidos en algún animal susceptible, o por el porcentaje de células destruidas de una monocapa epitelial crecida *in vitro*<sup>31</sup>.

Con base en la descripción de lesiones en diversos tejidos observadas durante la amibiasis invasora, se han inferido primero y luego identificado, varias actividades biológicas implicadas en la virulencia amibiana. Con las ya conocidas es posible integrar hipotéticamente la secuencia probable de los eventos que podrían ocurrir durante el proceso de invasión y destrucción de tejidos en la amibiasis invasora:

- 1) Evasión de la respuesta inmune,
- 2) Penetración de la película del moco intestinal que cubre el epitelio,
- 3) Adhesión al epitelio,
- 4) Penetración de la mucosa, lo que a su vez, es el resultado de varios efectos:
  - a) fagocitosis,
  - b) citólisis y
  - c) disolución del cemento intracelular
- 5) Colonización

Diversos estudios han establecido una cierta correlación entre marcadores de patogenicidad y grados variables de virulencia. La aglutinabilidad por concanavalina A, aunque no estrictamente cuantitativa, varía de acuerdo con la virulencia de la cepa amibiana. Lo mismo ocurre con la capacidad fagocítica y la velocidad de ingestión fagocitaria de glóbulos rojos de cepas patógenas amibianas. Una correlación semejante se ha observado entre el nivel de actividad colagenolítica y el grado de virulencia de algunas cepas patógenas. Por lo menos una de las citotoxinas intracelulares descritas en *Entamoeba histolytica* se encuentra en concentraciones más altas en cepas con mayor virulencia *in vitro*. La actividad hemolítica es mayor en homogenados de *Entamoeba histolytica* que en las cepas menos patógenas, como *E. invadens*, *E. moshkovskii* y la cepa Laredo de *Entamoeba histolytica*<sup>31</sup>.

#### **d. Papel de las bacterias**

El papel de las bacterias en la patogenia de la amibiasis se desconoce todavía. A pesar de los esfuerzos por dilucidar el importante papel que podrían desempeñar las bacterias, no existe una prueba concluyente que demuestre si las bacterias son o no indispensables para el establecimiento de *Entamoeba histolytica* y si la presencia de éstas ejerza o no alguna influencia en el incremento de la virulencia de algunas cepas del parásito<sup>24</sup>.

#### **e. Susceptibilidad y resistencia del hospedero**

Los requerimientos específicos para la supervivencia y el crecimiento de *Entamoeba histolytica* en la luz intestinal y en los tejidos, parecen ser muy complejos e incluyen rangos estrechos de temperatura, humedad, pH, potencial de oxido-reducción y ciertos elementos nutricionales entre otros. Todas estas circunstancias están influidas en cierto grado por una constelación de factores genéticos, fisiológicos, dietéticos, inmunológicos y otros del hospedero, muchos de los cuales todavía están poco definidos. Sin embargo, son las variaciones de estos factores las que probablemente explican que hospederos aparentemente idénticos, que reciben el mismo número de amibas de la misma cepa y por la misma vía, reaccionen de manera tan distinta; mientras unos desarrollan lesiones extensas que se expresan por síntomas clínicos graves, otros reaccionan muy poco o no reaccionan<sup>24</sup>.

## 1.5. Cuadro clínico de la amibiasis

Desde el punto de vista clínico, la amibiasis se ha clasificado de la siguiente manera:

### I. Amibiasis intestinal

- a) Aguda
- b) Crónica

### II. Amibiasis extraintestinal (según localización)

- a) Hepática
- b) Pulmonar
- c) Cerebral
- d) Mucocutánea
- e) Otras

**La amibiasis intestinal aguda** es una de las formas clínicas que se observan con mayor frecuencia. Se caracteriza por la presencia de evacuaciones diarreicas, posteriormente pueden evolucionar a síndrome disenteriforme caracterizado por evacuaciones mucosanguinolentas acompañada de pujo y tenesmo, en todos los casos, dolor abdominal que se exagera con la palpación, disentería fulminante, pérdida de peso, deshidratación, astenia, etc. Se debe puntualizar que un individuo infectado puede ser simplemente portador asintomático, presentar síntomas moderados o graves<sup>36</sup>.

Cuando la sintomatología tiene evolución de unos quince días se considera que el caso es **agudo**, en cuyo caso se presentan generalmente, evacuaciones frecuentes, líquidas o semilíquidas con presencia de moco, sangre y amibas, en fase de trofozoítos.

Cuando los síntomas persisten por más de un mes, y se alternan períodos con síntomas leves, constipación y reactivación de períodos agudos, entonces los casos se consideran **crónicos**, los cuales eliminarán quistes del parásito, con las materias fecales formadas. La amibiasis intestinal crónica en casi todos los casos evoluciona asintomática y ocasionalmente se presenta en los niños.

Se ha denominado **amibiasis extraintestinal** cuando los trofozoítos que están en el colon, invaden y se establecen en otros órganos.

La **amibiasis hepática** es la más frecuente y se puede presentar con las siguientes características: microabscesos, y abscesos agudos que evolucionan a la formación del absceso crónico. Al iniciarse las lesiones se ven multitud de "abscesos" microscópicos formados por un trofozoíto o unos cuantos trofozoítos en división y zona de lisis a su alrededor. Posteriormente habrá parénquima hepático lisado por acción de las enzimas de los trofozoítos, así como sangre, grasa, restos celulares, etc., que casi siempre será material líquido con color que va del café rojizo al chocolate.

La amibiasis hepática es un síndrome caracterizado por hepatomegalia, abscesos, fiebre elevada, dolor en hipocondrio derecho y a menudo leucocitosis con neutrofilia, que se presentan en las personas infectadas por trofozoítos de *Entamoeba histolytica*<sup>4, 36</sup>.

Las complicaciones del absceso hepático se manifiestan de la siguiente manera:

1.- Por ruptura y salida del contenido hacia órganos y cavidades vecinas ocasionando diseminación con mayor frecuencia al tórax, cavidad peritoneal y menos frecuentemente, al estómago, pericardio, intestinos y piel.

2.- Diseminación hematológica a partir del absceso hepático, en la que los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, serán arrastrados con la sangre al cerebro, pulmón, bazo, riñón, etc.

3.- Puede presentarse infección bacteriana agregada.

Cuando las amibas se establecen en la piel, producen lesiones que se caracterizan por su rápido crecimiento, muy dolorosas, de bordes levantados y bien definidos, secreción serosanguinolenta y un halo eritematoso.

Cuando las amibas se establecen e invaden otros órganos, como el cerebro, riñón, páncreas, etc., producirán cuadros clínicos con síntomas y signos no característicos que hacen muy difícil el diagnóstico clínico de este padecimiento en esas condiciones<sup>4</sup>.

## 2. Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis es un problema de salud pública por su frecuencia, morbilidad y mortalidad; es una infección ocasionada por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica* que se encuentra prácticamente en todos los países del mundo, pero sin lugar a dudas la mayor presencia e incidencia de la infección se encuentra en comunidades con condiciones socio-económicas deficientes en donde la sanidad ambiental y alimentación son inadecuadas<sup>36</sup>.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la amibiasis esta presente en alrededor de 500 millones de personas en todo el mundo (sin incluir la República de China), con un índice de morbilidad (personas con infección amibiana) anual del 10% (Cuadro 3)<sup>39</sup>.

### CUADRO 3

#### PREVALENCIA GLOBAL E INDICE DE LA AMIBIASIS

CONTINENTE	INDIVIDUOS INFECTADOS	INDIVIDUOS ENFERMOS (AHA* y colitis)	DEFUNCIONES
Norte y Sudamérica	95 000 000	10 000 000	10-30 000
Asia	300 000 000	20-30 000 000	20-50 000
Africa	85 000 000	10 000 000	10 30 000
Europa	20 000 000	100 000	
TOTAL	500 000 000	40-50 100 000	40-110 000

\*AHA, absceso hepático amibiano

Ref: Walsh, J., Amebiasis in the world, *Arch. Inv. Med.* (Méx.) 1986; 17 (Suppl):358-389.

Desde el punto de vista epidemiológico, hay cuatro países que presentan el mayor porcentaje de amibiasis: Egipto, India, Turquía y México.

La importancia que representa este problema de salud es que el índice de mortalidad anual, a causa de las complicaciones de la enfermedad, es de 50,000 a 100,000 personas<sup>38</sup>. Se sabe que de las enfermedades causadas por parásitos, la amibiasis ocupa el tercer lugar de mortalidad a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis<sup>39</sup>.

Las revisiones epidemiológicas realizadas por Walsh<sup>38</sup> indican que el número de personas infectadas con la amiba aumenta proporcionalmente al índice de natalidad a nivel mundial.

Las investigaciones más completas sobre epidemiología de ésta enfermedad se han realizado recientemente, y la gran mayoría de ellas pertenece a las últimas dos décadas. La frecuencia actual del padecimiento ha sido difícil de establecer debido a que prácticamente todas las encuestas se han realizado en muestras de poblaciones no representativas y no comparables entre sí, errores frecuentes en la identificación de los quistes por mala capacitación técnica del personal y la utilización de técnicas parasitológicas con sensibilidad diversa<sup>9</sup>, esto sin contar que en áreas endémicas hay una tendencia a sobreestimar la enfermedad como consecuencia de un gran número de casos de disenterias o diarrea con sangre, los cuales son fácilmente confundidos con amibiasis, por la similitud del cuadro clínico. Por otra parte, en áreas donde la enfermedad es poco frecuente el diagnóstico es subestimado y las amibas pasan por alto o bien no son debidamente identificadas en los exámenes coproparasitológicos; ésto es frecuente en, pacientes que provienen de áreas endémicas, así como en individuos considerados de alto riesgo, como homosexuales o pacientes mentalmente incapacitados.

La frecuencia de amibiasis intestinal no es un índice confiable para determinar la incidencia de enfermedad amibiana, debido a la dificultad para establecer el diagnóstico de la infección y a la tendencia en muchas regiones del mundo de considerar como amibianas a todas las disenterías de origen desconocido. Los síntomas más frecuentes son inespecíficos y, por consiguiente carecen de valor en estudios epidemiológicos y existen muy pocos estudios de enfermedad amibiana intestinal que se acompañen de la observación microscópica de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, así como de estudios sigmoidoscópicos que demuestren la existencia de lesiones ulcerativas en intestino<sup>24</sup>.

En un estudio de 439 casos de niños con disentería amibiana en la Ciudad de México, Gutiérrez Trujillo en 1971 encontró que el 47% era menor de un año de edad, el 76% tenía desnutrición grave y solo el 5.5% estaba alimentado de seno materno<sup>24</sup>.

En la Ciudad de México, de 1972 a 1974 en dos hospitales pediátricos se estudiaron 11,523 niños con diarrea o síndrome disentérico, se identificaron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en 249 casos (2.2%) y la mayor incidencia (45%) ocurrió en los niños de uno a cuatro años de edad<sup>16</sup>. En la misma ciudad, Muñoz y col. de 1976 a 1977, encontraron en un grupo de 343 niños con diarrea aguda el 2% de infección por *Entamoeba histolytica*<sup>26</sup>, mientras que Castañeda-Castañeira y col. en 1978 informaron un 19.4% de infección por *Entamoeba histolytica* en un grupo de 103 niños y Serafin y col. en 1980 informaron un 9% de infección por este parásito en 513 niños, ambos grupos con diarrea sanguinolenta o disentería<sup>24</sup>. En Venezuela Romer y col. en 1978 describieron el 11.1% de 253 niños con diarrea, en los que se identificaron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y lesiones intestinales por rectosigmoidoscopia<sup>24</sup>.

En un estudio de 800 pacientes adultos con diarrea aguda o disentería realizado en la Ciudad de México en 1970 a 1971, la frecuencia de rectocolitis amibiana diagnosticada por estudio endoscópico fue de 13.8%, realizado por Pardo-Gilbert en 1971<sup>24</sup>. En Lagos,

Nigeria, Nnochiri en 1965 encontró de 1945 pacientes con diarrea o disenterías que 315 pacientes (16,2%) fueron positivos para quistes o trofozoítos de *Entamoeba histolytica*<sup>24</sup>.

A pesar de las dificultades existentes para establecer el diagnóstico de amibiasis intestinal, así como las deficiencias para el registro de esta enfermedad en el mundo, con cierta seguridad puede afirmarse que se trata de la forma más frecuente de enfermedad amibiana. En las áreas endémicas, una proporción significativa de todos los casos de diarrea aguda es ocasionada por *Entamoeba histolytica* y estas cifras son aún más elevadas en los casos de diarrea con sangre o síndrome disentérico. Los problemas técnicos inherentes a los procedimientos diagnósticos que comprenden el estudio de heces, particularmente la correcta identificación del parásito, han obligado al uso de otros indicadores para estimar con mayor precisión la frecuencia y distribución de la infección y enfermedad amibiana.

Por esta razón, en los últimos años, los métodos inmunológicos han sido de gran ayuda tanto en el diagnóstico de la amibiasis invasiva o extraintestinal, como en estudios seroepidemiológicos para evaluar el alcance que tiene este padecimiento en diversas poblaciones.

Es importante establecer la diferencia que existe entre infección y enfermedad amibiana, es decir, entre personas que tienen el parásito sin presentar síntomas, que se conocen como portadores asintomáticos y aquellos con sintomatología definida. Esto es necesario, ya que en un mismo país se presentan tasas muy variables de infección.

En México, a partir de 1972 se han efectuado varias encuestas seroepidemiológicas. Así, Landa y col.<sup>15</sup> estudiaron 7,532 sueros de pacientes de hospitales del Distrito Federal y Yucatán, por medio de la técnica Contrainmunolectroforesis (CIEF) y utilizando antígeno obtenido de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*, encontrando una frecuencia que

oscila entre el 5 y 6 %. En ese mismo año, Gutiérrez y col<sup>7</sup> realizaron una encuesta serológica, en 766 niños del Distrito Federal, usando la misma metodología, obteniendo una seropositividad del 3.9%, que varía de acuerdo con la edad, ya que después del primer año de edad el porcentaje de positividad aumentó progresivamente.

La encuesta seroepidemiológica más amplia que se ha realizado en México es la practicada por Gonzalo Gutiérrez y col. en 1974<sup>9</sup>, quienes utilizaron la técnica de Contraímmunoelectroforesis (CIEF) en 19,442 sujetos que vivían en 46 localidades urbanas de la República Mexicana, consideradas como representativas de todas las áreas geoeconómicas y geomórficas del país. El estudio mostró que el 5.95% de los habitantes era portador de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* aunque la frecuencia variaba entre el 9.95% en la región centro-occidental y el 2.53% en la región nor-oriental. También se observó un incremento de la frecuencia de seropositividad a partir del primer quinquenio de vida, para alcanzar su máximo entre los cinco y los diez años de edad, excepto en la región centro-occidental donde la seropositividad más elevada se encontró en los menores de cinco años; posteriormente descendió ligeramente en el siguiente quinquenio y se conservó en valores semejantes el resto de la vida. No obstante la magnitud de la encuesta, la población estudiada pertenecía a derechohabientes del IMSS, presentando en consecuencia un rasgo definido, por lo que el análisis de las diferentes poblaciones no fue, en general el apropiado.

En México, el 5.95% de sus habitantes, en promedio, es portador de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica*, pero la frecuencia varía entre el 2.53% y el 9.95% según su distribución geográfica. Ocupa el cuarto lugar en frecuencia entre las enfermedades transmisibles, con una tasa de casi el 1% y aumenta constantemente. En 1970 la amibiasis ocupó el cuarto lugar como causa de muerte en el Hospital General de la Secretaría de Salubridad y Asistencia y su frecuencia fluctuó entre el 4.7% y 5.7%, con respecto al número total de autopsias practicadas en los mayores hospitales generales de la Ciudad de

México<sup>31</sup>.

Recientemente, Halabe Cherem y col.<sup>10</sup> realizaron un estudio en 54,859 muestras, las cuales se analizaron por el método de faust (técnica coproparasitoscópica de flotación), donde se encontraron 4,482 pruebas positivas para *Entamoeba histolytica*, lo que corresponde a un 8.17%, siendo estos resultados los más elevados de protozoarios parásitos patógenos.

### 3. Métodos de Diagnóstico

Las técnicas coproparasitológicas son aquellas con las que se realizan exámenes de la materia fecal con el fin de buscar e identificar las diversas formas parasitarias, tales como: quistes, huevos, larvas, trofozoitos de protozoarios y formas adultas de helmintos.

Los métodos de diagnóstico usuales para la detección de *Entamoeba histolytica* son: el examen coproparasitológico directo para búsqueda de trofozoitos, diversos exámenes coproparasitológicos para búsqueda de quistes, frotis y tinción permanente y diversos cultivos.

El diagnóstico de certeza en cualquier localización de *Entamoeba histolytica* en el organismo humano, es precisamente la localización de trofozoitos y quistes, aunque en algunas ocasiones, sobre todo en amibiasis extraintestinales, es difícil poner de manifiesto los trofozoitos, por lo que en la actualidad se han desarrollado una serie de reacciones inmunológicas como las de CIEF, IEF, ELISA, etc.<sup>36</sup>.

El diagnóstico de la amibiasis puede ser sencillo y directo, cuando se identifica a la amiba en heces y se asocia a la sintomatología de la disentería amibiana; o bien indirecto, cuando se identifica al anticuerpo en suero o algún otro fluido biológico.

### 3.1. Técnicas Coproparasitológicas o Directas

En los casos de amibiasis intestinal aguda, se deberán buscar los trofozoitos de *E. histolytica* mediante un exámen de al menos tres muestras de materia fecal fresca sin teñir, que presentan movimientos característicos, este método recibe el nombre de "Observación Directa en Fresco". Las muestras son obtenidas sin administrar purgante al paciente, ni conservadores o fijadores, deben ser procesadas casi de inmediato sin haberlas sometido a cambios bruscos de temperatura, ya que de otra manera, los trofozoitos se lisan y no se detectarán en las muestras. De preferencia se hará frotis y tinción con cualquiera de los colorantes que se usan para protozoos intestinales (hematoxilina férrica de Haidenheim, tricrómico de Gomori, etc.), en los cuales se determinarán las características morfológicas de los trofozoitos que servirán para hacer el diagnóstico preciso. En ocasiones, sobre todo en adultos en los que un poco de tardanza en el diagnóstico no pone en peligro su vida, se efectúa siembra y cultivo de la materia fecal en el medio de Broeck y Dvrolav (huevo-sangre), o algún otro medio de cultivo para amibas, los cuales se observarán directamente a las 24-48 horas<sup>36</sup>.

En el caso de adultos, las muestras son obtenidas fácilmente poniéndolas en frascos limpios y de boca ancha, en algunas ocasiones para observar el tipo de lesiones se tiene que recurrir a la rectosigmoidoscopia y tomar las muestras de materia fecal, biopsias o bien raspados de las úlceras para buscar a las amibas, en este caso se hará observación directa en fresco, frotis y tinción, cultivo y cortes histológicos teñidos con hematoxilina-cosina, para búsqueda de trofozoitos o de algún otro posible agente etiológico (Micobacterias, cáncer, etc.)<sup>36</sup>

Cuando se trata de lactantes, no es conveniente obtener la muestra del pañal, porque con frecuencia ya se habrán destruido los trofozoitos, por lo que se recomienda el uso de

cucharilla rectal, la que es una varilla de vidrio con borde romo y doblado, que se introducirá unos cuantos centímetros en el recto del lactante, se hará girar para que se obtenga la muestra de materia fecal, se saca y se deposita en el tubo de ensaye que tiene solución salina isotónica estéril, así éstas muestras deberán ser observadas de inmediato al microscopio.

En el caso de la amibiasis intestinal crónica, como la eliminación es de quistes y no de trofozoitos, el método de laboratorio que se emplea para encontrarlos con mayor facilidad es el **Coproparasitoscópico (CPS) de Concentración** que también deberá ser seriado (al menos 3 muestras). Los exámenes coproparasitoscópicos de concentración, tienen por objeto concentrar los quistes, huevos o larvas de los parásitos que pudieran estar presentes en las materias fecales.

Los métodos coproparasitoscópicos de concentración pueden ser **Cualitativos** y **Cuantitativos**, y dependiendo del tipo de parasitosis que un individuo presente; se selecciona la técnica más conveniente.

Los Métodos Coproparasitoscópicos de Concentración **Cualitativos** se dividen en:

1.- Concentración por Flotación<sup>30</sup> entre los que se encuentran:

- a) Método de Faust
- b) Método de Willis
- c) Método con solución de sacarosa

2.- Concentración por Sedimentación<sup>30</sup> entre los que se encuentran:

- a) Método de Ritchie
- b) Método de Charles-Barthelemy
- c) Métodos en Copas Telemán

Los Métodos Coproparasitológicos de Concentración **Cuantitativos**<sup>30</sup> son los siguientes:

- a) Método de Ferreira
- b) Método de Stoll (dilución)
- c) Método de Kato y Miura (frotis)

Uno de los métodos más utilizados por el laboratorio clínico para hacer un diagnóstico preciso de amebiasis intestinal crónica, es el Método de Faust, el cual es un examen coproparasitológico de concentración por centrifugación flotación.

Este método de concentración por centrifugación flotación fue introducido por Faust y colaboradores en 1938, para la concentración de quistes de protozoarios, así como huevos de helmintos. En 1979 García y Ash, modificaron la técnica con el fin de reducir el margen de error del método, y es el que actualmente se utiliza en el laboratorio.

## **METODO DE FAUST**

### **FUNDAMENTO<sup>4,29</sup>**

Esta técnica es cualitativa, se basa en la utilización de una solución de mayor densidad ( $ZnSO_4$  densidad 1.180) con el fin de crear un gradiente de densidad en el cual las formas parasitarias de menor peso específico (1.05 - 1.11), floten en la superficie de la solución.

Además de la densidad, un requisito que no hay que olvidar es que el medio de suspensión empleado no deshidrate los quistes o huevos, ni sea absorbido por ellos.

Esta técnica de concentración por flotación funciona adecuadamente para el análisis de muestras conservadas o fijadas con formol al 10%, obteniéndose resultados satisfactorios.

Sawitz, (1942) determinó que el peso específico de *E. histolytica* y *E. nana* es de aproximadamente 1.065 - 1.070; el peso específico de *E. coli* un poco mayor; *Giardia lamblia* 1.060; y cerca de 1.180 *Ch. mesnili*. De los huevos de helmintos el peso específico aproximado de *A. duodenale* es de 1.055; *T. trichura* de 1.150 y *A. lumbricoides* de 1.110-1.200.

En cuanto a las limitaciones del método se puede decir que es poco eficaz para huevos pesados como los de *Taenia sp.*, *Fasciola hepatica* u óvulos de *Ascaris lumbricoides*.

## METODO

El material biológico que se utiliza en este método es materia fecal, con la cual se prepara una suspensión homogénea con 1 a 2 g y 10 ml de agua corriente. Se filtra a través de una coladera o gasa para que la muestra sea recibida en tubos de ensaye, los cuales son centrifugados durante 45 a 60 segundos a 2300 r.p.m. Se decanta el sobrenadante, añadir 2 a 3 ml de agua, agitar y se llena el tubo con agua (este paso se repetirá de dos a tres veces, hasta que el agua esté limpia). Se decanta el agua del último lavado, se añaden 3 a 4 ml de Sulfato de Zinc ( $\delta=1.180$ ), se agita el tubo para homogeneizar el sedimento y se agrega más reactivo hasta aproximadamente un centímetro del borde del tubo. Se centrifuga durante 45 a 60 segundos a 2300 r.p.m. . Con un asa bacteriológica se toman varias asadas de la

película superficial y se colocan en un portaobjetos, se agrega una gota de lugol, se mezcla y se cubre con una laminilla. Por último se observa con los objetivos 10x y 40x<sup>30</sup>.

## **FORMA DE REPORTAR**

Para reportar los hallazgos en las preparaciones, primero se escribe la fase o estadio en la cual se encuentra el parásito y en seguida la especie.

***PRECAUCIONES:*** Se debe verificar la densidad de la solución de Sulfato de Zinc periódicamente, o de preferencia prepararla cada tercer día, según el volumen de trabajo diario, ya que se puede perder fácilmente la densidad alterándose los resultados. Después de agregar la solución de Faust, es necesario tomar inmediatamente la muestra para su lectura, debido a que si permanecen los tubos mucho tiempo con la muestra, las formas parasitarias pueden degenerarse o sedimentarse. Dado el carácter infectante de la materia fecal, se deben de tomar las precauciones pertinentes<sup>4, 30</sup>.

### 3.2. Técnicas Serológicas o Indirectas

Utilizando técnicas coproparasitológicas, es frecuente cometer errores en el diagnóstico: debido a que el estudio coproparasitológico generalmente resulta en sobrediagnóstico, mientras que induce a resultados falsos negativos en casos de amibiasis invasora; por esta razón también se han utilizado las técnicas indirectas como son las serológicas, usadas para la investigación de la amibiasis, las cuales son de ayuda en el diagnóstico clínico, en estudios epidemiológicos y terapéuticos en amibiasis extraintestinal, específicamente en el Absceso Hepático Amibiano (AHA), y para confirmar la infección amibiana cuando la sintomatología que se presenta se confunde con otras enfermedades intestinales. Estos métodos determinan diferentes clases y niveles de anticuerpos, y su sensibilidad y especificidad varía circunstancialmente.

Existen diversos métodos serológicos para medir los anticuerpos anti-amibianos, cada uno con diferente sensibilidad y especificidad: hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, Ouchterlony, inmunoelectroforesis, contrainmunoelectroforesis, análisis inmunoenzimático, fijación del complemento y aglutinación con látex. Hasta el momento no parece existir una prueba de elección para estimar la prevalencia de anticuerpos anti-amibianos, ya que cada una tiene sus ventajas y desventajas<sup>24</sup>.

**HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI).** Es una técnica de gran sensibilidad y especificidad, capaz de detectar anticuerpos que pueden persistir por muchos años después de una infección amibiana.

Los métodos en **GEL DE AGAR** incluyen: **OUCHTERLONY**, **INMUNOELECTROFORESIS** y **CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)**. La CIEF es más sensible que los otros métodos de difusión en agar, con la ventaja de su sencillez y rapidez; reacciona solamente con aquellos anticuerpos que resultan de una ambiasis invasora reciente. Su reactividad es baja y la prevalencia de infección activa detectada por este método es menor que la obtenida mediante HIA, que es una técnica más sensible que detecta la presencia pasada y presente del parásito.

**AGLUTINACION CON LATEX (AL)**. Es comparable en sensibilidad y especificidad con la difusión en agar, pero más simple. Los anticuerpos detectados con HAI o AL son demasiado persistentes, lo que disminuye su utilidad para el diagnóstico clínico, si bien el último método es conveniente en estudios epidemiológicos, sus principales problemas radican en el costo del producto comercial y en el hecho de que sustancias como el factor reumatoideo y otro tipo de anticuerpos IgM, pueden producir un gran número de resultados falsos positivos.

**INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)**. Es una técnica altamente sensible y específica que puede identificar anticuerpos de tipo IgG o IgM contra *Entamoeba histolytica* y combinada con difusión en agar puede ser utilizada para diferenciar infecciones antiguas y recientes. Aunque la preparación de antígenos específicos para esta prueba es sencilla, la imposibilidad de automatización es una desventaja importante. Stamm y col. en 1976 consideraron a la IFI superior a HAI y AL como prueba de escrutinio clínico, especialmente en áreas de baja endemidad y recomiendan utilizarla con difusión en agar, para el seguimiento de infecciones<sup>24</sup>.

El **ANALISIS INMUNOENZIMATICO (ELISA)** es una prueba cuantitativa para el diagnóstico de amibiasis, extremadamente sensible debido a que da un 100% de positividad en casos de AHA y solamente un 3.6% en controles normales<sup>40</sup>, fácil de realizar y puede ser automatizada para procesar miles de muestras a la vez. Puede detectar anticuerpos IgG o IgM específicos contra *Entamoeba histolytica* y probablemente sea capaz de diferenciar infecciones antiguas y recientes, lo que ofrece ventajas en estudios seroepidemiológicos.

En el estudio de la epidemiología de la amibiasis, las encuestas serológicas pueden proporcionar información valiosa, pero para su correcta interpretación es necesario tomar en cuenta las diferencias en especificidad y sobre todo en sensibilidad, de las diferentes técnicas serológicas, especialmente cuando se desea comparar los hallazgos en diferentes áreas y estudios. Es indispensable tener en cuenta también el tamaño y características de la población muestreada en cada encuesta. Muchas de las diferencias pueden ser debidas a errores o defectos provenientes de una muestra insuficiente o del uso de técnicas de muestreo inadecuadas.

## **METODO ENZYMEBA**

### **FUNDAMENTO**

ENZYMEBA es una técnica inmunoenzimática en la que se establece la interacción entre la histolisina (**histolisina**) (proteasa) sintetizada y excretada a las heces por *Entamoeba histolytica* y su correspondiente anticuerpo. Para su realización, se utilizan placas o tiras de poliestireno que se recubren con anticuerpos específicos contra la enzima.

Las muestras y los controles se incuban durante 4 horas a 4°C en los pozos de las placas correspondientes (si una muestra o control contiene la enzima, ésta se unirá específicamente a la superficie del pozo). Las placas o tiras se lavan para eliminar las interacciones inespecíficas e inmediatamente a cada pozo se agrega una solución con el sustrato correspondiente (apéndice 1). Tras una nueva incubación, de 16 horas a 37 °C, se agrega una solución que detiene la reacción (apéndice 1) y que genera el desarrollo de color. La aparición inmediata de coloración entre rosado y rojo es indicativa de que el sustrato fue hidrolizado, y por lo tanto, de infección por *Entamoeba histolytica*<sup>19, 27</sup>.

## GENERALIDADES SOBRE LA HISTOLISINA

Las cisteín (tiol) proteasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han identificado en plantas, animales, virus, bacterias y microorganismos eucarióticos. Aunque existen variaciones estructurales entre las cistein-proteasas de diferentes *filas*, todas ellas son endopeptidasas con un intervalo de peso molecular de 15,000 -80,000 y tienen un residuo cisteínico crítico que corresponde al sitio activo que involucra la hidrólisis del sustrato. Las cistein-proteasas han sido identificadas en numerosos parásitos protozoarios, incluyendo: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*; además en diversos parásitos helmintos tales como *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica* entre otros<sup>5</sup>.

La histolisina es la principal cisteín proteasa de *Entamoeba histolytica*, esta enzima tiene un peso molecular aparente (Mr) de 29,000, la máxima actividad de la enzima fue encontrada *in vitro* para los sustratos sintéticos Z-Arg-Arg-NHMec y Z-Phe-Arg-NHMec, que como se puede ver contienen arginina a un pH óptimo de 9.5. De éstos sustratos la

enzima mostró el mayor grado de especificidad para el sustrato Z-Arg-Arg-NHMec<sup>18</sup>.

Se encontró que el inhibidor irreversible más efectivo para la histolisina fue Z-Leu-Met-CHN<sub>2</sub>; además de otros inhibidores como la cistatina de pollo, E-64 y el ácido iodoacético<sup>18</sup>.

La importancia que tiene la histolisina en la invasión tisular es que no degrada colágeno tipo I o elastina, pero es activa contra cartilago de proteoglicano y colágeno de la membrana basal glomerular del riñon. También ocasiona separación de las células de su sustrato *in vitro*.

Es de esperarse que una proteasa que juega un papel importante en la invasión tisular muestre actividad contra macromoléculas de la estructura extracelular, es por ello que resulta muy significativo que la histolisina degrade la membrana basal glomerular de riñon humano.

El hecho de que la histolisina ocasione la separación de células en cultivo es consistente con la posibilidad de que ésto sea idéntico al factor citopático y enterotóxico descrito previamente por otros investigadores<sup>18</sup>.

Es posible que la actividad de la histolisina contra el colágeno de la membrana basal, junto con su propiedad de separar las células juegue el papel principal en su penetración por la superficie epitelial del intestino<sup>18</sup>.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 1. Material biológico

El material biológico utilizado para este estudio consistió en muestras de materia fecal, las cuales fueron proporcionadas por clínicas y hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) e Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

Las muestras de materia fecal recolectadas en las clínicas del IMSS se obtuvieron en pequeños recipientes (COPROPACK) que la misma institución proporciona a cada paciente para depositar tres muestras seriadas, sin embargo, no siempre el número de muestras en cada copropack fue el indicado. Por otra parte, en el caso de los hospitales del ISSSTE fueron obtenidos en frascos proporcionados por el mismo paciente, los cuales depositan una muestra por frasco durante tres días consecutivos y también en este caso, no todos los pacientes hacen la entrega total de las tres muestras.

Las muestras se utilizaron en su mayoría frescas, y fueron conservadas a 4°C, analizándose dentro de las 24 horas posteriores a su colecta. En algunas ocasiones cuando la prueba no se realizó inmediatamente o dentro de las 24 horas posteriores a su recolección, estas fueron congeladas hasta el momento de la prueba. La congelación no produce efectos adversos en el ensayo de las muestras y se pueden conservar así, hasta 30 días antes para su análisis.

Los controles positivo y negativo utilizados en el método ENZYMEBA fueron proporcionados por el juego de reactivos, donde el control positivo consistió en un liofilizado de la enzima purificada la cual reconstituida con agua destilada, una vez

hidratada debe ser almacenada a -20°C.

Además del análisis de muestras fecales para detección de amebiasis por el método ENZYMEBA, se hizo la recolección de datos de análisis de materia fecal por el método coproparasitológico (CPS) de Faust, realizado por el IMSS y el ISSSTE, bajo el siguiente sistema de muestreo:

Se recolectaron muestras de seis clínicas familiares del IMSS y de dos hospitales regionales pertenecientes al ISSSTE. El procedimiento de recolección se realizó por medio de un muestreo al azar y recolectándose un total de 799 muestras.

Es importante mencionar que antes de aplicar el método ENZYMEBA a las muestras se desconocían los resultados obtenidos por el método coproparasitológico (CPS) de Faust.

## **2. Procedimiento del método ENZYMEBA**

El método ENZYMEBA se aplicó a las 799 muestras siguiendo las especificaciones y recomendaciones del instructivo contenido en el juego de reactivos, utilizando reactivos, soluciones y controles que proporciona el juego de trabajo (apéndice 1 y 2).

Se colocaron los controles positivo y negativo en los pozos correspondientes en las tiras de poliestireno sensibilizadas con el anticuerpo anti-histolisina, seguido de esto, se colocaron las muestras (previamente homogeneizadas y reposadas durante una hora a

temperatura ambiente) en los pozos correspondientes, posteriormente se llevó a cabo un período de incubación a 4°C durante 4 horas en cámara húmeda; pasado el periodo de incubación se retiraron las muestras y controles por volteo rápido para después realizar tres lavados con una solución amortiguadora, secando las tiras en posición invertida sobre papel filtro. Se agregó a cada pozo el reactivo activador-sustrato (apéndice 2) para que se llevara a cabo la reacción enzima-sustrato, procediéndose a una segunda incubación ahora por 16 horas a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, se adicionó un reactivo para detener la reacción enzimática (apéndice 2) y un reactivo de color (apéndice 2) preparado dentro de la hora anterior al momento de su uso para de esta manera llevar a cabo la lectura de la prueba en los pozos correspondientes a cada muestra.

**Resultado Positivo:** Se considerarán positivas las muestras en cuyos pozos apareció de manera inmediata una coloración entre rosado y rojo.

**Resultado Negativo:** Se considerarán negativas las muestras en cuyos pozos apareció una coloración amarilla de intensidad variable.

Es importante mencionar que en esta prueba la interpretación de resultados también puede llevarse a cabo fotométricamente empleando un lector ELISA con un filtro de 520 nm, utilizando el blanco con aire.

### 3. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados tanto del método ENZYMEBA y el método coproparasitoscópico (CPS) de Faust, fueron analizados por medio de un análisis de varianza bifactorial bajo un diseño completamente al azar<sup>35</sup>, en el cual se determinó el efecto de los métodos y el diagnóstico (positivo y negativo) sobre la presencia de *Entamoeba histolytica* en las muestras.

Debido a que los resultados presentaron una distribución binomial, se hizo una transformación arcsénica (apéndice 3) de la variable de respuesta (presencia de *Entamoeba histolytica*) para la realización del análisis de varianza, cuando la interacción del factor método y diagnóstico fue significativa al 0.10 de probabilidad ( $\alpha = 0.10$ ), las medias se separaron por el método de Tukey a un  $\alpha = 0.05$  para determinar la diferencia entre éstas.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 2 se indica el porcentaje de detección de *Entamoeba histolytica* obtenido con el método coproparasitológico (CPS) y el método ENZYMEBA en el diagnóstico de casos positivos y negativos, así como la comparación de los mismos. Como se puede observar el método coproparasitológico (CPS) diagnostica un número significativamente mayor de casos positivos que el método ENZYMEBA, sin embargo la confiabilidad de ENZYMEBA es mayor debido al reconocimiento específico de la histolisina sintetizada por la amiba.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la diferencia que existe entre los dos métodos es de considerable importancia respecto al diagnóstico de casos positivos y negativos para *Entamoeba histolytica*.

El análisis de varianza (apéndice 3) señaló un efecto significativo de la interacción Método-diagnóstico sobre la presencia de *Entamoeba histolytica*, por lo que se procedió a separar porcentajes de incidencia diagnosticados por uno y otro método.

Los resultados del método coproparasitológico y el método ENZYMEBA mostrados en la figura 2 indicaron a simple vista que el método coproparasitológico (CPS) detecta un número mayor de casos positivos para *Entamoeba histolytica*, lo cual no significa que el método sea más confiable que el método ENZYMEBA, ya que el método morfológico presenta varias limitaciones que van desde la toma de muestra hasta la lectura de la prueba.

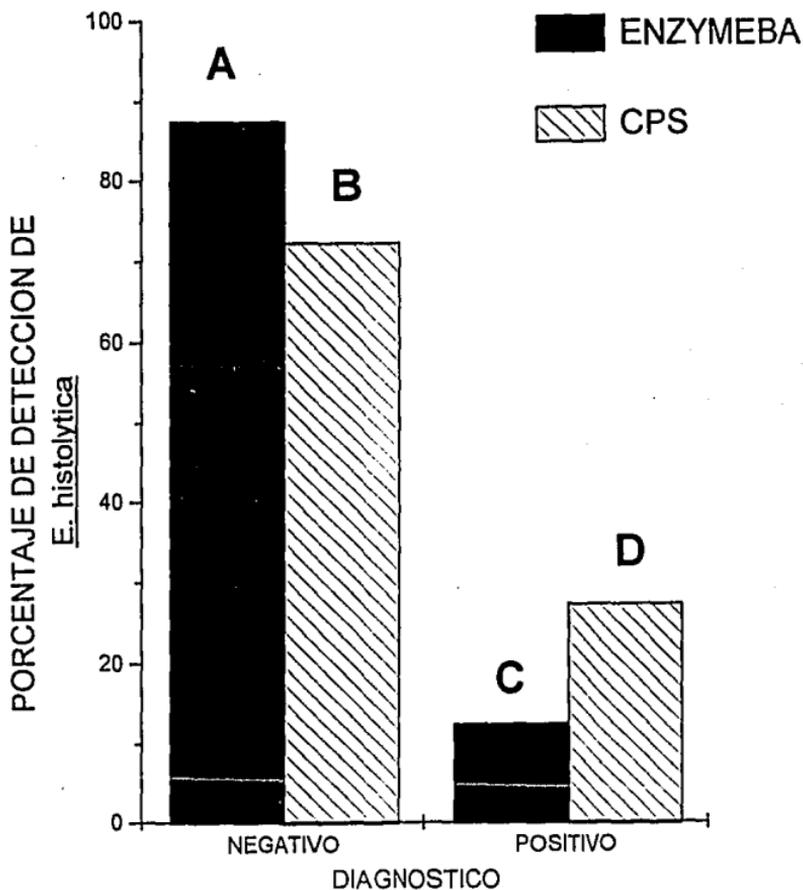


Figura 2. Porcentaje de detección de E. histolytica detectada por el método CPS y ENZYMEBA. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey, 0.05).

En el caso de la toma de muestra existen variaciones de una institución a otra. Actualmente en el IMSS le proporcionan al paciente un pequeño recipiente (COPROPACK) en el cual tiene que almacenar al menos 3 muestras seriadas de materia fecal y llevarlas al laboratorio; en relación a esto no se puede asegurar: que efectivamente el paciente haga entrega de al menos las 3 muestras y segundo si desde la obtención de la primera muestra, ésta se ha conservado en condiciones adecuadas para la realización del estudio. Por otra parte, en el ISSSTE el paciente hace entrega de las tres muestras por separado en frascos de vidrio y aunque en este caso se conoce el número de muestras que se analizan por paciente; finalmente, se observa la misma situación que en el IMSS, ya que no todos los pacientes entregan el total de muestras. Esto significa que al estar directamente relacionada la sensibilidad con el número de muestras analizadas, la confiabilidad del método varía significativamente.

La diferencia que existe para detectar *Entamoeba histolytica* por el método de Faust y el método ENZYMEBA, se debe básicamente al procedimiento de ambas técnicas como se indica en el cuadro 4. Este cuadro comparativo lo que muestra son las diferencias que existen entre el método coproparasitoscópico (CPS) y el método ENZYMEBA, también cabe mencionar que el método morfológico presenta limitaciones que ocasionan errores en su diagnóstico, como ya se mencionó en los resultados, este diagnostica un mayor número de casos positivos para *Entamoeba histolytica*, lo que ocasiona un alto índice de resultados falsos positivos, esto se debe a que el personal que se encarga de la interpretación de resultados debe tener la habilidad y la experiencia para no confundir los quistes del parásito en estudio con otros artefactos. Por otra parte la preparación del reactivo debe tener una densidad adecuada ya que en caso contrario podría suceder que las formas infectantes de los parásitos (quistes) no se concentren y suban a la superficie para tomar la muestra, o bien que se acumulen diferentes estructuras no específicas, lo que ocasionaría resultados falsos positivos o falsos negativos, según el caso.

### Cuadro 4

## COMPARACION DE LAS TECNICAS COPROPARASITOSCOPICA (CPS) Y ENZYMEBA

	CPS	ENZYMEBA
<b>FUNDAMENTO</b>		
	Conc. quistes de diversos parásitos	Detección de histolisina (enzima específica)
<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>		
No. Muestra	3 seriadas	solo 1
Cant. Muestra	3-5 ml	10 µl
<b>MATERIAL</b>		
Equipo	Centrífuga, Microscopio	Micropipeta automática
Reactivos	ZnSO <sub>4</sub> , δ=1.180	Equipo comercial
<b>PROCEDIMIENTO</b>		
Lavados de la muestra	SI	NO
Centrifugación	SI	NO
Cant. de muestras interpretadas en 10 min.	1	hasta 96
Desarrollo de la prueba por muestra (hs)	1 hs	24 hs
Personal técnico	Especializado	Técnico lab., Médico, Enfermeras, etc.
Lectura	Observación al microscopio	Observación visual aparición de color
<b>*CONFIABILIDAD</b>	1a. mtra. 40-50% 2a. mtra. 55-65% 3a. mtra. más 80%	95-98% Sensibilidad 98-100% Especificidad

\* (24, 18,27 y datos no publicados)

Lo contrario al método morfológico ocurre con ENZYMEBA debido a que las fuentes de error son menores. En primer lugar ENZYMEBA sólo necesita de una muestra de materia fecal para dar un diagnóstico de certeza, utilizando una menor cantidad de la misma; no requiere de aparatos costosos, además, la interpretación de resultados es mucho más sencilla ya que solo se detecta la aparición de un color, por lo que no requiere de personal capacitado para la realización de la técnica e interpretación de resultados. De acuerdo con lo anterior, se puede decir que ENZYMEBA es un método más confiable, porque además se trata de una reacción inmunoenzimática específica contra una proteína propia de *Entamoeba histolytica*.

Con respecto al diagnóstico de casos positivos en la comparación del método coproparasitoscópico (CPS) y el método ENZYMEBA se observa (Figura 3) una tendencia constante en ambas instituciones (IMSS e ISSSTE), del método coproparasitoscópico (CPS) a detectar un mayor porcentaje de muestras positivas en comparación con el método ENZYMEBA, lo que indica que ambos métodos son diferentes en cuanto a la detección de *Entamoeba histolytica*; lo anterior no significa que el método coproparasitoscópico sea más confiable, ya que por este método se da un sobrediagnóstico de amibiasis intestinal, lo cual se debe a que el método tiene limitaciones que van desde la toma de muestra hasta la lectura de la prueba.

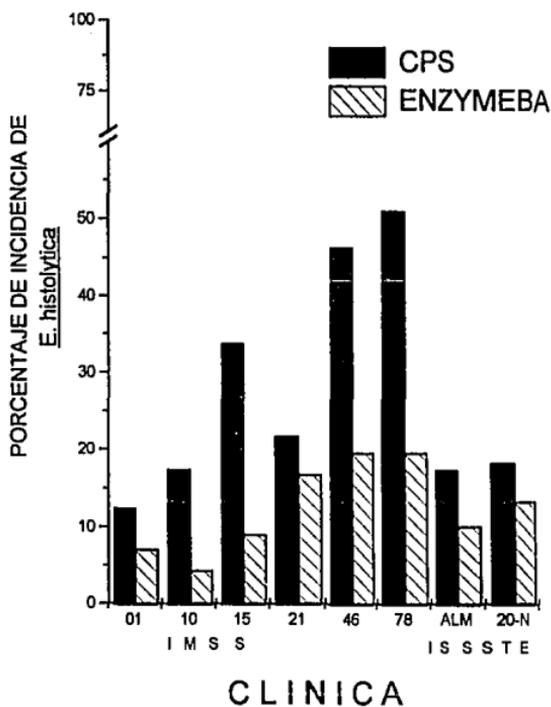


Figura 3. Comparación por clínica de la incidencia de E. histolytica en heces por los métodos de CPS y ENZYMEBA

Las implicaciones clínicas que se pueden generar por un sobrediagnóstico de amibiasis intestinal invasiva, son de seria consideración debido a que el tratamiento para esta infección es sumamente agresivo y si se aplica a un paciente que realmente esta infectado, el medicamento no solo destruirá al parásito, si no que además, atacará de manera importante la flora normal del intestino, por otra parte, si el tratamiento se aplica a un individuo cuyo resultado fue un falso positivo toda la acción del medicamento se dirige hacia la flora normal afectando así, en mayor grado el equilibrio ácido-base, (potencial de oxidoreducción) con las subsecuentes modificaciones en las poblaciones de microorganismos del intestino que a su vez, genera condiciones favorables para el establecimiento de infecciones oportunistas.

La investigación epidemiológica también podría verse afectada por el sobrediagnóstico de amibiasis intestinal invasiva ya que, los datos falsos positivos no proporcionan información fidedigna, que resulte valiosa para la obtención de conclusiones sobre la relación entre las condiciones socio-económicas y la incidencia de la infección en una población determinada.

Otra forma de comparar la confiabilidad de ambos métodos es analizando el número de casos negativos obtenidos con dichos métodos; se observó una tendencia por parte de clínicas y hospitales que participaron en el estudio, a determinar mayor número de casos negativos utilizando el método ENZYMEBA, lo anterior apoya la observación realizada en los casos positivos, es decir, la presencia de un sobrediagnóstico por parte del método coproparasitoscópico (CPS), dada la diferencia de casos negativos que presenta respecto al método ENZYMEBA. Por otra parte, sería conveniente realizar la lectura espectrofotométrica del método ENZYMEBA, para la cuantificación de la actividad enzimática, lo que tendría aplicaciones no solo a nivel de diagnóstico, sino también de seguimiento terapéutico y la evaluación de nuevos medicamentos.

**Cuadro 5.**

**Incidencia de Infección por *Entamoeba histolytica* utilizando el Método ENZYMEBA, según la zona y condición socioeconómica en el D.F. y zona conurbada.**

Clinica /Hospital	Zona	Inciden cia (%)	Condición Socioeconómica
1	Cuauhtémoc	7.1	Media alta
10	Benito Juárez	4.3	Media alta y media baja
15	Iztapalapa	9.0	Media baja
21	V. Carranza	16.7	Media alta y media baja
46	Tlalpan	19.6	Media alta y media baja
78	Netzahualcoyotl	19.6	Media baja y baja
A.L.M.	Coyoacán	10.1	Media alta
20-Nov.	Benito Juárez	13.3	Media alta y media baja

Partiendo de los resultados positivos obtenidos por el método ENZYMEBA se hizo un análisis de la incidencia de infección por *Entamoeba histolytica* en algunas zonas del Distrito Federal y zonas conurbadas. (Cuadro 5).

Debido a la diversidad socio-económica y al abastecimiento de agua potable que presenta la población se establece una gran variación en la incidencia de infección en diversas clínicas y hospitales del IMSS e ISSSTE respectivamente localizadas en diferentes zonas del Distrito Federal.

Aun cuando el objetivo del estudio no es realizar una investigación epidemiológica, resulta interesante observar que la proporción de casos determinados por ENZYMEBA se relacionan de manera directa con las condiciones socio-económicas, abastecimiento de agua potable y otros factores que propician la incidencia de la infección en cada zona.

Es evidente que una investigación de campo utilizando las ventajas que ofrece ENZYMEBA resultaría de gran utilidad para obtener información epidemiológica más confiable, donde la investigación debe planearse de acuerdo a las características de la población, así como de la respectiva muestra, de las condiciones de recolección de la misma y de las características del método de identificación.

Se sugiere la realización de estudios posteriores para incrementar la confiabilidad del método ENZYMEBA; esto podría ser a través de la purificación de la enzima (histolisina), para el estudio *in vitro* de su actividad catalítica en presencia de diferentes fármacos que normalmente se administran a pacientes con amibiasis intestinal y/o extraintestinal. Con estos estudios se descartaría la presencia de resultados falsos negativos promovidos por la inactivación de la enzima por acción de éstos fármacos.

Es importante dejar claro que el principal problema en el diagnóstico de certeza de amibiasis intestinal invasiva a través del método morfológico, radica fundamentalmente en el exceso de detección de casos falsos positivos para *Entamoeba histolytica*. De acuerdo a lo anterior se puede llegar a las siguientes conclusiones:

#### **IV. CONCLUSIONES**

- 1.- Por medio del método coproparasitoscópico (CPS) se determinaron más casos positivos que al utilizar el método ENZYMEBA.
- 2.- Por medio del método ENZYMEBA se determinaron más casos negativos que al utilizar el método coproparasitoscópico (CPS).
- 3.- De acuerdo a lo anterior, el método ENZYMEBA proporciona un diagnóstico más confiable comparado con el método coproparasitoscópico (CPS) en cuanto a la presencia de *Entamoeba histolytica* en pacientes con sospecha de amibiasis intestinal.

## APENDICE 1

### Material, Reactivos y Soluciones

#### Proporcionados en el equipo ENZYMEBA

A Tiras de poliestireno de 8 pozos cada una, recubiertas con con anticuerpos anti-histolisina en una dilución 1:100 (v/v).

B Soporte para tiras

#### C Reactivos:

- \* Fco. No. 1: Control Positivo Liofilizado
- \* Fco. No. 2: Control Negativo Liofilizado
- \* Fco. No. 3: Tampón para lavados (solución concentrada 20 veces)
- \* Fco. No. 4: L-Cisteina 2mM, pH 9.5 (6 fcos.)
- \* Fco. No. 5: Buffer Gli-EDTA
- \* Fco. No. 6: Sustrato (Z-Arg-Arg-Mna 100 uM)\*\*
- \* Fco. No. 7: Fast Garnet
- \* Fco. No. 8: Etanol absoluto
- \* Fco. No. 9: Acido clorhídrico
- \* Fco. No. 10: Nitrito de sodio
- \* Fco. No. 11: Reactivo detenedor (p-cloromercuribenzoato 5mM)

\*\* Z-Arg-Arg-Mna = Benziloxycarbonil-L-arginil-L-arginina 2-(4-metoxi)-naftilamida

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **Estabilidad**

- 1.- Los componentes del equipo de diagnóstico ENZYMEBA deben ser conservados a temperatura entre 2 y 8°C.
- 2.- La exposición de los reactivos a temperatura ambiente por cortos períodos de tiempo no afecta la estabilidad de los mismos.

## APENDICE 2

### Preparación de Reactivos Intermediarios

- 1.- **Control es** : Reconstituir los controles (fcos. No. 1 y No. 2) en 3 ml de agua destilada (después de reconstituidos deben mantenerse a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- 2.- **Amortiguador para lavados**: Diluir los 100 ml del tampón 20x contenidos en el frasco No. 3 hasta 2000 ml en agua destilada.
- 3.- **Activador** : Disolver el contenido del frasco No. 4 en 50 ul de tampón Gli-EDTA (fco. No. 5). Agregar 3 ml de agua destilada (estable 24 horas).
- 4.- **Activador - Sustrato** : Añadir 60 ul de sustrato (fco. No. 6) a la mezcla anterior (activador). El volumen de activador-sustrato preparado (aproximadamente 3.5 ml) es suficiente para realizar la prueba en un par de tiras de 8 pozos.
- 5.- **Reactivo 7-8-9** :En el frasco No. 7 añadir 1 ml del contenido del frasco No. 8. Disolver e inmediatamente agregar, agitando, 600 ul del contenido del frasco No. 9. Agregar 400 ul de agua destilada (almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante no más de un mes).
- 6.- **Reactivo de Color** : Colocar un tubo de ensayo en una mezcla de agua y hielo. En este, mezclar 50 ul de reactivo 7-8-9 y 5 ul de nitrito de sodio (fco. No. 10). Incubar en estas condiciones durante 6 minutos. Añadir 5 ml de reactivo detenedor (este volumen de reactivo de color, que es estable a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas, es suficiente para realizar la prueba en un par de tiras de 8 pozos).

### APENDICE 3

**Tabla de Análisis de Varianza de la Comparación del método Coproparasitoscópico (CPS) y ENZYMEBA para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces.**

K	Fuente de Variación.	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
2	Factor A	1	1152.000	1152.000	6.8691
4	Factor B	1	22313.281	22313.281	133.0480
6	AB	1	439.561	439.561	2.6210
-7	Error	28	4995.837	167.708	
	Total	31	28600.680		

Coefficiente de Variación: 29.43%

Factor A = Método (A)

Factor B = Diagnóstico (B)

AB = Método \* Diagnóstico (AB)

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barret, Alan J., (1972), "A New Assay for Cathepsin B1 and other thiol Proteinases". *Analytical Biochem.*, 47:280-293.
- 2.- Barret, Alan J., (1973), "Human Cathepsin B1", *Biochem. Journal*, 131:809-822.
- 3.- Barret, Alan J., and Kirschke, Heidrun, (1981), "Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L.", *Methods in Enzymology.*, 80,41:535-539.
- 4.- Faust, Craig, (1961), *Parasitología Clínica*, Editorial UTEHA, 2a. Edición.
- 5.- Ann E. Eakin, J. Bouvier, J.A. Sakanari, Ch. S. Craik and J. M. Mckerrow, (1990), "Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites"., *Molecular and Biochemical Parasitology.*; 39:1-8.
- 6.- Gutiérrez-Trujillo, G., (1971), "Aspectos clínicos de la amibiasis invasora en niños", I. Amibiasis Intestinal., *Arch. Inv. Med. (Méx.)*, 2 (Suppl 1):349-354.
- 7.- Gutiérrez G., Aubanel, M., (1972), "Encuesta serológica en niños de la Ciudad de México", VII Investigación de anticuerpos contra *E. histolytica*, *Arch. Inv. Med. (Méx.)*, 3 (Suppl 2):371-376.
- 8.- Gutiérrez, Gonzalo, M.C., M.S.P., (1986), "Epidemiología de la Amibiasis en México", *Bol. Men. Epidemiología*, 1, 4:45-51.

- 9.- Gutiérrez, Gonzalo, (1986), Epidemiología y Control de la Amibiasis en México, *Arch. Inv. Med.*, 17 (Suppl):375-383.
- 10.- Halabe Cherem, José, Than Gómez, Ma. Teresa, Cortes Lawrenz, J., Laredo Sánchez, Fernando, Wachter Rodarte, Niels, Lifshitz Guinzberg, Alberto, Flisser, Ana, (1992), "Una Aproximación a la reevaluación de los exámenes coproparasitoscópicos", *Gaceta Médica de México*, 128, 2:134-137.
- 11.- Gadasi, Hana and Kobiler, David, (1983), "*E. histolytica*: Correlation between Virulence and Content of Proteolytic Enzymes", *Exp. Parasitology*, 55:105-110.
- 12.- Grundy, M. S., (1982), "Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool samples", *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 76, 3:396-400.
- 13.- Keene, William E., Pettit, Matthew G., Allen, Susan and McKerrrow, James H., (1986), "The Major Neutral Proteinase of *Entamoeba histolytica*", *J. Exp. Med.*, 163:536-549.
- 14.- Keene, William E., Hidalgo, Ma. Eugenia, Orozco, Ester and McKerrrow James H., (1990), "*Entamoeba histolytica*: Correlation of the Cytopathic Effect of Virulent Trophozoites with secretion of Cysteine Proteinase", *Exp. Parasitology*, 71:199-206.
- 15.- Landa, L., Aubanel, M., Segovia, E., Sepúlveda, B., (1972), "Seroepidemiología de la amibiasis en adultos", *Arch. Inv. Med.* 3 (Suppl 2):377-380.
- 16.- Lara Aguilera, R., Alvarez Chacón, R., Lugo Savage, J.L. and Pantoja Vega, A., (1976), "Current facts on the frequency of invasive intestinal amebiasis in children", In: B. Sepúlveda and L.S. Diamond (Eds.) Proceedings of the International Conference on Amebiasis, IMSS, México, D.F.,:787-792.

- 17.- Levine, N., Corliss J., Cox, F., Deroux., (1980), "A newly revised classification of the protozoa", *J. Protozool.*, **27**:37-40.
- 18.- Luaces, Alfredo and Barret, Alan J., (1988), "Affinity purification and biochemical characterization of Histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*", *Biochem Journal.*, **250**:903-909.
- 19.- Luaces, Alfredo, Pico, T. and Barret, A. J., (1992), "The ENZYMEBA test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immuno-enzymatic detection of histolysin.", *Parasitology*, **105**: 203-205.
- 20.- Lushbaugh, William B., Hofbaver, Ann F. and Pittman, Fred E., (1984), "Proteinase Activities of *Entamoeba histolytica* Cytotoxin", *Gastroenterology*, **87**:17-27.
- 21.- Lushbaugh, William B., Hofbaver, Ann F. and Pittman, Fred E., (1985), "*Entamoeba histolytica*: Purification of Cathepsin B", *Exp. Parasitology*, **59**:328-336.
- 22.- Martínez-G., Ma. Carmen, Hernández-Velarde, R., Castro-Delgado, J.M., Ramos-Ramírez, Leticia, Muñoz, Onofre and Gutiérrez, Gonzalo, (1986), "Epidemiology of amebiasis in a rural community of México; serologic and coproparasitoscopic survey", *Arch. Inv. Med.*, **17** (Suppl): 369-374.
- 23.- Martínez Palomo, Adolfo, M.C., (1986), "La Amibiasis como Problema de Salud Pública", *Bol. Men. Epidemiología*, **1** (3):29-32.
- 24.- Martínez Palomo, Adolfo, (1989), AMIBIASIS 1a. Edición., Ed. Panamericana
- 25.- McKerrow, James H., (1989), "Parasite Proteases", *Exp. Parasitology*, **68**:111-115.

- 26.- Muñoz H., O., Coello Ramirez, P., Serafin A., F., Olarte, J., Pickering, L. K., Dupont, H. and Gutiérrez, G., (1979), "Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y moco fecal", *Arch. Inv. Med.*, **10**:135-145.
- 27.- Osorio, L. M., Pico, T. and Luaces, A., (1992), "Circulating antibodies to histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*, in amoebic liver abscess patients", *Parasitology*, **105**:207-210.
- 28.- Pardo-Gilbert, A., (1971), "Frecuencia de la Rectocolitis amibiana aguda en diversas unidades del IMSS en el D.F. y en el Valle de México", *Arch. Inv. Med.*, **2** (Suppl-1):335-336.
- 29.- Romer, H., Pérez de Suárez, E., de Lares, A., de Dávila, D., de los A. Gómez, M., de Galindo, M., de Fermín, C., Yamín, Y., de Torres, B., Esparza, J., Alvarez, N. and Torres, P., (1978), "La amibiasis intestinal en el niño. I. Estudio etiológico de las lesiones de colon rectosigmoideo", *Arch. Inv. Med.*, **9**, (Suppl 1):375-380.
- 30.- Salazar Shettino, Paz María y de Haro Arteaga, I., (1986), Manual de Técnicas para el Diagnóstico de las Parasitosis, Editorial Fco. Méndez Cervantes., 1a. edición.
- 31.- Said-Fernández, Salvador, (1990), "Factores de Virulencia de *Entamoeba histolytica*", *Arch. Inv. Med.*, **21**:253-262.
- 32.- Scholze, Henning and Werries, Eckhard, (1986), "Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica*. I. Partial Purification and action on diferents enzymes", *Mol. and Biochem. Parasitology*, **18**:103-112.
- 33.- Serafin F., Castañeda, E., Díaz, S., Palacios, O. and Gutiérrez-Trujillo, G., (1980) "Evaluación diagnóstica y terapéutica en la amibiasis intestinal invasora del niño", *Arch. Inv. Med.*, **11** (Suppl 1):291-298.

- 34.- Sepúlveda, B., (1970), "La amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica*", *Gac. Med. Méx.*, 100:201-210.
- 35.- Steel, R.G. y J. H. Torrie., (1985), *Bioestadística: Principios y Procedimientos*: McGraw Hill. México. p.622.
- 36.- Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez M., (1989), *Parasitología Médica*, Ed. Fco. Méndez Cervantes, 1a. edición.
- 37.- Ungar, Beth L. P., Yolken, Robert H. and Quinn, Thomas C., (1985), "Use of a Monoclonal antibody in an Enzyme Immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens", *Am. L. Trop. Med. Hyg.*, 34, 3:465-472.
- 38.- Walsh, Julia A., (1986), "Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality". *Rev. Inf. Dis.*, 8, 2:228-238.
- 39.- Walsh, Julia A., (1986), "Amebiasis in the world", *Arch. Inv. Med.*, 17 (Suppl ):385-389.
- 40.- Yang, J., Kennedy, M., (1979), "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of amebiasis", *J. Clin. Microbiology.*, 10:778-781.