

11227

DE LA BIBLIOTECA  
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
EN ENFERMEDADES DEL APARATO DIGESTIVO

**HOSPITAL REGIONAL 1° DE OCTUBRE  
I.S.S.S.T.E**

**EVOLUCION DE LA RESPUESTA DE  
ANTICUERPOS ANTI-E.histolytica DESPUES DE  
TRES AÑOS DE UN ABSCESO HEPATICO  
AMIBIANO.**

**TESIS DE ESPECIALIDAD**

MEDICINA INTERNA

**QUE PRESENTE EL**

**M.C. RICARDO EZEQUIEL AGUILAR VARGAS**

**MEXICO D.F.**



2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: AGUILAR JESUS  
R. CORONA FREDYEL

FECHA: 22 III 2011

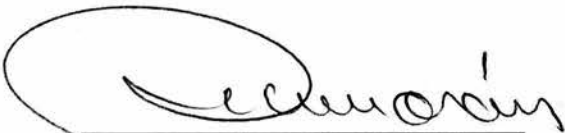
FIRMA: 



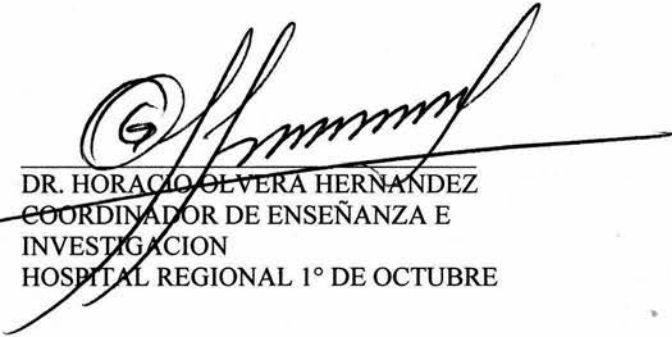
DR. MANUEL RAMIRO HERNANDEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DE MEDICINA INTERNA



DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA  
DRA. EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
ASESORA DE TESIS



DRA. PATRICIA MORAN SILVA  
COORDINADORA DE ENSEÑANZA E  
INVESTIGACION.  
HOSPITAL REGIONAL 1° DE OCTUBRE



DR. HORACIO OLVERA HERNANDEZ  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA E  
INVESTIGACION  
HOSPITAL REGIONAL 1° DE OCTUBRE



A mis Padres, a quienes debo el milagro de haber nacido  
y este gran esfuerzo, plasmado hoy en mi realidad.

A mi linda esposa y a ese pequeño ser que trae ahora dentro,  
quiero brindarles esto que siento como un triunfo en mi vida  
y que quiero compartir por siempre con ellos.

A las Doctoras Cecilia Ximénez y Patricia Morán, así como  
a todo el equipo del Laboratorio de Biología experimental del  
Hospital General de México, quienes me abrieron las puertas  
y me brindaron todas las facilidades para la realización de  
ésta tesis.

Por último quiero dar gracias a Dios por permitirme alcanzar esta meta,  
y a toda esta gente tan linda, por quien siento un gran respeto y cariño.

**RICARDO E. AGUILAR**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6-8
ABSTRACT	9-10
ANTECEDENTES	11-14
JUSTIFICACION	15
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODOS	
DISEÑO DEL ESTUDIO	16
DESCRIPCION DE LA MUESTRA GRUPO DE ESTUDIO	16
SEGUIMIENTO	16
SUJETOS DE ESTUDIO	
TAMAÑO DE LA MUESTRA	16
CRITERIOS DE INCLUSION	16
CRITERIOS DE EXCLUSION	16
PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	
TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE SALIVA	17
TRATAMIENTO DE SANGRE	17
TRATAMIENTO DE HECES	17
DESCRIPCION DE LA TECNICA PARA CPSCD	17
DESCRIPCION DE LA TECNIA PARA COPROPARASITOSCOPICO POR CONCENTRACION CPSC.	
DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIAMIBIANOS	18
DETECCION DE ANTICUERPOS EN SALIVA	19
RECURSOS HUMANOS	20
RECURSOS MATERIALES	20

## INDICE

RESULTADOS	21-23
DISCUSION	24-26
CONCLUSIONES	24-26
BIBLIOGRAFIA	27-29
TABLAS Y FIGURAS	30-37

## RESUMEN

### INTRODUCCION

La amibiasis continua siendo uno de los problemas de salud prioritarios en nuestro país, cuyo principal reservorio es el hombre, definida de acuerdo a la OMS se considera amibiasis a la presencia de *E.histolytica* en el huésped humano ya sea de manera asintomática como en el caso de los portadores sanos ó sintomática como en la amibiasis intestinal invasora o el absceso hepático amibiano, el cual es la forma más frecuente de amibiasis invasora. Cualquiera que sea su presentación, es posible detectar títulos de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica*, principalmente a nivel sérico, sin embargo, al parecer no existe una correlación entre los títulos altos de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad amibiana, estos se han detectado en fases tempranas de la enfermedad invasora y persisten aún después de la curación, cuando la infección por *Entamoeba histolytica* ha sido controlada.

### OBJETIVO:

Determinar si existe correlación entre la persistencia de títulos altos de anticuerpos séricos IgG o IgAs, secretora en saliva en individuos con antecedentes de absceso hepático amibiano (AHA), y la presencia de reinfección o repetición de un proceso invasor.

### MATERIAL Y METODOS:

El estudio se inició con una población integrada por 18 pacientes con diagnóstico de AHA, después de participar durante los primeros 18 meses, por razones personales 9 abandonan el estudio. Al resto de los pacientes se les continuó el seguimiento entre 3 y 6 años después de su reclutamiento. El seguimiento consistió en un estudio clínico periódico durante el cual se les tomaron muestras de sangre, saliva y materia fecal ésta última en serie de 3. Las muestras de heces fueron analizadas mediante examen coproparasitológico directo (CPSCD) y por concentración (CPSC); el suero y la saliva



se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-amibianos por medio de la técnica de ELISA.

#### RESULTADOS:

De los 18 pacientes estudiados (15) correspondieron al sexo masculino y (3) al sexo femenino con un promedio de edad de 36 años ( $\pm 1$  año) 2 de los pacientes estudiados con AHA se siguieron durante 2 años durante 3 años; 3 durante cinco años y 2 durante seis años. El examen coproparasitológico resultó ser positivo para *E.histolytica* / *E.-dispar* en el 5% de los pacientes inicialmente incluidos en el estudio y negativo en el 100% de los individuos muestreados durante el seguimiento después del tratamiento. Los resultados de la determinación de anticuerpos séricos y secretores muestran que hasta los 12 meses los niveles de anticuerpos en ambos compartimientos permanecen por arriba de la línea de corte establecida para la prueba (0.5) en más del 88% de los individuos estudiados la cual se calculó con la media de la D.O. obtenida en el suero y saliva de controles no infectados más dos desviaciones estandar. Aquellos individuos que llegaron a los 3 años ( 2 ), 5 (3) y 6 años (2) se observó que sus niveles séricos y secretores disminuyeron considerablemente manteniéndose siempre por abajo de la línea de corte. Cabe mencionar que uno de los pacientes fué ingresado al estudio después de haber tenido dos abscesos hepáticos documentados 2 años antes de su inclusión en el estudio.

#### CONCLUSION:

Se desconoce hasta hoy si en el hombre los anticuerpos anti-amibianos en individuos que previamente se hayan expuesto o desarrollado una enfermedad invasora por *E.histolytica* tienen un papel protector. Se ha mencionado que dichos anticuerpos persisten elevados por mas de 10 años después de la curación.

De acuerdo a nuestros resultados podemos mencionar que los niveles de anticuerpos circulantes en nuestro estudio, encontramos que al parecer los niveles de anticuerpos anti-amibianos, disminuyen con el tiempo y por otro lado no parece haber correlación entre los niveles séricos de IgG y los niveles de IgA secretora en la saliva de estos individuos.

Por otro lado, los resultados en cuanto al seguimiento a través del muestreo de heces para su análisis microscópico sugieren de alguna manera un fenómeno de resistencia a la infección ya que después del tratamiento no se detectaron nuevos períodos de infección a pesar de que en la mayoría de los casos, su entorno y sus hábitos higiénicos y alimenticios no variaron de manera substancial.

Sin embargo, sería necesario tener los datos de infección por *E.histolytica/E.dispar* en la población incluida como control, quienes claramente mostraron niveles de IgG e IgAs antiamebianos por abajo de la línea de corte.

## ABSTRACT

### BACKGROUND

Amoebiasis is still one of the priority health problems worldwide, man is the major host of this parasitosis, according to the WHO, amoebiasis is considered as the presence of *E.histolytic* in the human host, either asymptotically as in the case of healthy subjects or symptomatically as in invasive amoebiasis or amoebic liver abscess, which is the most common high invasive form of amoebiasis. Whatever is its presentation, it is possible to detect high anti *E.histolytic* antibody levels specially at serum level, however there is no relation between antibody titers and seriousness of amoebiasis disease have been detected at early stages of the invasive disease and they persist after healing, when infection by *E.histolytica* has been controlled.

### OBJETIVE

The objective of the present work, was to determine the relation between the persistence of high serum antibody levels of IgG or secretory IgAs in saliva, of individuals with record from amoebic liver abscess and the presence of re-infection or an invasive relapse process.

### MATERIAL AND METHODS

18 subjects with amoebic liver abscess (ALA) were analyzed during the first 12 months. Due to personal reasons 9 patients abandoned the trial. The rest of the patients were followed between 3 and 6 years after recruitment. Follow-up consisted of a periodical and clinical study were blood, saliva samples and feces samples were obtained, these last in a 3-times series. Feces samples were analyzed by direct microscopic examination and by concentration with zinc sulphate gradient. Serum and salival were analyzed to determine the presene of antiamoebic antibody livels through ELISA technique.

### RESULTS

Of the 18 studied patients 15 were men and 3 were women, mean age was 36 years ( $\pm$  1 year), 1 of the studied patients with ALA were followed during 2 years; 2

during 3 years; 4 over 5 years and 2 over 6 years. The microscopic examination was positive for *E.hystolitica/E.dispar* in the 5% of the patients admitted in this study and all were negative after treatment during the entire follow-up. Results of serum and secretory antibody determination demonstrated that until the twelfth month antibody levels remained high over the cut off line (D.O 0.555) in more than 88% of studied individuals. This was calculated with the mean of O.D. values in serum and saliva from non-infected controls plus two standard deviations. Individuals were followed during 3 years (2), 5(3) and 6 years (2). It was observed that the secretory and serum antibody levels decreased considerably after 36 months of follow-up.

#### CONCLUSION:

It is not known if high anti-amoebic antibodies in individuals with antecedents of invasive amoebiasis are protective or not.

According to our results, we found out that anti-amoebic antibody levels decreased after approximately 24 months after healing. On the other hand, there is no relation between serum IgG and secretory IgAs in saliva samples.

The present results suggest a phenomenon of infection resistance, since after treatment new infection periods were not detected, in spite that nourishing and sanitary habits do not change substantially. However, we have to remark that infection events in the control group were also absent. More studies in this direction are necessary to clarify the role of antibodies in the immune response in amoebiasis.

## ANTECEDENTES

Fedor Losch, fue el primero en describir la presencia de la movilidad de trofozoítos de un microorganismo al que llamó "*Amoeba coli*" en las heces de trabajadores con disentería, en la Ciudad de San Petersburgo en 1875 (1). Posteriormente demostró la patogenicidad de las amibas al provocar la enfermedad en un perro alimentado con materia fecal disentérica (2). Durante los siguientes 16 años, otros autores confirmaron las observaciones de Losch, como Kartulis, en Egipto en 1886, quién estableció el papel de la amiba como causa de lesiones intestinales y hepáticas en sujetos con diarrea. Posteriormente Walker y Sellards disiparon toda duda acerca de la patogenicidad de la *Entamoeba histolytica* (*E.histolytica*) con sus detallados estudios en Filipinas en 1913.

La historia de la amibiasis se ha destacado por una serie de epidemias bien estudiadas, como la de Chicago en 1933 (3) y la de Indiana en 1950 (4).

Schaudinn en 1903, reservó el nombre de *Entamoeba coli*, para la especie no patógena, que albergan individuos asintomáticos e introduce el nombre de *Entamoeba histolytica* para la amiba productora de disentería (5).

Sin lugar a duda el hombre es el reservorio más importante de *Entamoeba histolytica*; en donde los portadores de cepas virulentas y los pacientes con diferentes formas clínicas de amibiasis son la principal fuente de infección. La amibiasis es un ejemplo de lo que se ha definido como "Patología de la pobreza" (6), incluyéndose la desnutrición, los malos hábitos de higiene, la utilización de agua no potable para el consumo humano y el riego de hortalizas con aguas negras. Además de coexistir factores de riesgo tales como la edad, sexo, estado nutricional y el alcoholismo, que pueden en un momento dado favorecer la persistencia del agente dentro del huésped.

Durante mucho tiempo se mantuvo en duda si una amiba que origina una infección asintomática, pudiera ser una especie totalmente diferente y permanecer simplemente como comensal en el intestino del huésped. Siendo hasta 1925, cuando Brumpt estableció la existencia de dos grupos de amibas totalmente distintas y propuso la subdivisión de la especie *Entamoeba histolytica* en dos grupos uno al que denominó *Entamoeba dispar* (forma no patógena) y otra *E. disenteriae* para la amiba causante de enfermedad (forma patógena) (7). Peter Sargeunt en 1978, comparó más de 6000 aislados del parásito, haciendo historia clínica y serológica de cada uno de los individuos infectados, encontrando que en un porcentaje muy alto de los casos, el perfil isoenzimático de las amibas patógenas estaba asociado con infección sintomática y el perfil isoenzimático de las amibas aisladas de portadores asintomáticos permitía diferenciales como un grupo aparte, motivo por el cual Sargeunt retoma las ideas de Brumpt, acerca de los dos diferentes tipos de amibas, y denomina *Entamoeba dispar* a las formas no invasoras y *Entamoeba disenteriae* para las formas invasoras del parásito (8).

Actualmente, después de una serie de estudios bioquímicos y genéticos no queda duda acerca de la existencia de dos amibas morfológicamente indistinguibles, una capaz de producir daños tisular y enfermedad (*E. histolytica*) y otra forma inocua incapaz de producir enfermedad (*E. dispar*) (9,10).

A partir de 1997 en que se reunió un comité de expertos auspiciado por la OMS se decidió que la presencia de quistes tetranucleados con diámetro aproximado 20µm en las heces en un examen coproparasitológico debía reportarse como quistes de *E. histolytica/E. dispar* ya que a ese nivel no se pueden diferenciar ambas especies (11).

La amibiasis es la segunda causa de muerte después de la malaria, debido a infecciones parasitarias a nivel mundial, calculándose que alrededor de 500 millones de individuos están infectados por *E. histolytica/E. dispar*, el 10% tiene alguna forma de amibiasis invasora y el 1% muere por esta enfermedad (12); en México, la relación

podría ser de alrededor de un paciente con amibiasis invasora por cada cinco portadores sanos (13).

Sin embargo, no fue sino hasta los años 70s en que Diamond (1978) (14) logró cultivar axénicamente a las amibas, obtenidas de individuos infectados que se pudieron realizar estudios de detección de anticuerpos en el suero de pacientes con formas invasoras de amibiasis (intestinal o hepática), encontrando que los títulos de anticuerpos dirigidos contra el parásito estaban particularmente elevados a partir de las primeras semanas de iniciada la enfermedad. En un principio los antígenos amibianos utilizados para la detección de anticuerpos fueron extractos crudos preparados de manera muy diversa por los diferentes laboratorios, así como las técnicas inmunológicas utilizadas para la detección de anticuerpos (15). Por otro lado, se demostró que la presencia de anticuerpos circulantes solo se daba cuando existía un fenómeno invasor como en la amibiasis invasora intestinal o el absceso hepático amibiano.

Ha quedado de hecho prácticamente establecido que solo las infecciones por *E.histolytica* son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos circulantes (Abd Alla, 1995). Sin embargo, existen datos que demuestran en zonas con alta endemicidad de *E.histolytica/E.dispar* que la infección por *E.dispar* la cual es asintomática, también induce la formación de anticuerpos antiamebianos circulantes aunque en general los niveles de tales anticuerpos no suelen ser tan elevados como en los procesos invasores ocasionados por *E.histolytica* (17).

Durante varias décadas fue muy complicado el análisis comparativo de los resultados de estudios serológicos en la amibiasis especialmente los estudios seroepidemiológicos ya que se utilizaron para ellos diferentes preparados antigénicos y diferentes técnicas inmunológicas en su elaboración.

Los primeros resultados dejaron claro que no existía correlación entre títulos de anticuerpos antiamebianos y la gravedad de la enfermedad invasora en el humano, al contrario de lo que suele suceder en la infección experimental en modelos animales. Por otro lado, los títulos altos de anticuerpos aparecen tempranamente durante la enfermedad y persisten por mucho tiempo después de la curación (meses o años), muy probablemente debido a exposiciones subsecuentes al parásito o a la persistencia de antígeno en el sistema retículo endotelial del huésped (18).

Actualmente éstas dificultades han sido abordadas por diferentes grupos intentando ofrecer alternativas para la elaboración de pruebas diagnósticas que permitan la detección de casos nuevos de amibiasis invasora en áreas endémicas, utilizando para ello la técnica de ELISA con antígenos recombinantes de *Entamoeba histolytica* ó específicos reconocidos por anticuerpos anti-amibianos solo durante la fase aguda de la enfermedad invasora y que dejan de ser reconocidas antes de 6 meses después del inicio de la enfermedad (19) lo cual ofrece grandes ventajas para su utilización en estudios epidemiológicos.

Por otro lado, más recientemente se ha visto que en la infección asintomática (portadores sanos) sólo una proporción baja de individuos producen anticuerpos circulantes, sin embargo la mayoría, alrededor del 70% tienen anticuerpos secretores (IgAs) inducidos a nivel intestinal, los cuales pueden ser detectados en la saliva de estos individuos así mismo los pacientes con amibiasis invasora intestinal o absceso hepático amibiano también tienen niveles altos de anticuerpos IgAs secretores y contrariamente a lo que se suponía estos anticuerpos pueden también persistir durante largos períodos después de la curación. Hasta el momento no sabemos el papel que estos anticuerpos secretores tengan en la resistencia hacia la reinfección o en el mantenimiento del estado de portador ó en la eliminación espontánea del parásito.

Es por ello que en el presente trabajo hemos querido reclutar un grupo de pacientes con absceso hepático amibiano, a quienes hemos seguido durante un período que va desde los 12 meses hasta los 6 años, durante los cuales se ha estudiado la evolución de su respuesta de anticuerpos anti-amibianos circulantes y anticuerpos anti-amibianos secretores así como la detección de la presencia del parásito *E.histolytica/E.dispar* en las heces, con el objeto de poder correlacionar sus niveles de anticuerpos con el fenómeno de reinfección durante el tiempo de observación.



## JUSTIFICACION:

Debido a la importancia que sigue teniendo el absceso hepático amibiano en nuestro país, hemos querido contribuir con el estudio de la respuesta de anticuerpos tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico inducida por la infección por *E.histolytica* llevando a cabo un estudio longitudinal con el objeto de relacionar el comportamiento de la respuesta de anticuerpos y la posible reinfección o la reincidencia de un cuadro invasor.

## OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el comportamiento de la respuesta de anticuerpos séricos y secretores en pacientes con absceso hepático amibiano, en un estudio de seguimiento durante 1 a 6 años después del diagnóstico de la enfermedad y su relación con una posible reinfección.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Conjuntar un grupo de pacientes con absceso hepático amibiano después de otorgar un consentimiento informado.
- 2) Realizar un seguimiento clínico y parasitológico a través de por lo menos 12 meses después del inicio de la enfermedad.
- 3) Detectar anticuerpos séricos y secretores antiamebianos por medio de la técnica de ELISA con una periodicidad de 6 meses.
- 4) Hacer una correlación entre la presencia de niveles altos de anticuerpos séricos o secretores con la presencia de quistes de *E.histolytica/E.dispar* en el examen coproparasitológico.

## MATERIAL Y METODOS:

Se estudiaron 18 pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano confirmado clínica y sonográficamente en el Hospital Regional 1° de Octubre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Para su inclusión en el estudio se les informó sobre el protocolo de investigación y se pidió su colaboración para participar durante al menos 12 meses de seguimiento.

## SEGUIMIENTO:

Durante el seguimiento fuera del hospital se les citó periódicamente para la obtención de muestras fecales y saliva aproximadamente cada tres meses y para la obtención de suero cada seis meses, durante la entrevista se interrogaron para investigar la presencia de diarreas y síntomas compatibles con una la reactivación del absceso hepático o el desarrollo de un nuevo cuadro invasor. Al cabo de 12 meses algunos de los pacientes se retiraron voluntariamente del estudio (5) o fueron excluidos por cambio de domicilio fuera del Distrito Federal (4) quedando nueve pacientes los cuales fueron citados telefónicamente para acudir al servicio de urgencias adultos del Hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE, a quienes se les había solicitado llevar consigo 3 muestras de materia fecal; además de la correspondiente toma de muestras sanguíneas (5 ml) y colección de saliva (5 ml); para posteriormente ser sometidos a exploración física y un cuestionario de sus hábitos higiénico-dietéticos; todo ello supervisado por un médico residente de 4° año del servicio de medicina interna y una enfermera general.

## CRITERIOS DE INCLUSION:

Pacientes con diagnóstico clínico y sonográfico de absceso hepático amibiano, con títulos altos de anticuerpos IgG e IgA anti-amibianos detectados por ELISA y respuesta rápida al tratamiento con anti-amibianos tisulares.

## PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO:

### Tratamiento de las muestras de saliva:

La saliva de los individuos se colectó en tubos cónicos de 5 ml, la cual posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm, durante 30 min. a 4°C, mientras que los sobrenadantes se colectaron en alícuotas que se mantuvieron a -70°C hasta el día de su utilización (20).

### Tratamiento de la sangre:

El suero se obtuvo por los métodos convencionales a partir de 5 ml de sangre venosa de los individuos en estudio.

### Tratamiento de las heces:

Coproparasitoscópico directo (CPSCD) y por concentración (CPSC). A cada paciente se le solicitaron tres muestras de heces para la realización del examen microscópico con tinción de Iodo y el CPSC en gradiente de sulfato de zinc para detectar la presencia de quistes de *E.histolytica/ E. dispar* (21) .

### Descripción de la técnica para CPSCD:

En un portaobjetos de 75 mm X 25 mm, se colocó una gota de lugol parasitológico y tomando una muestra de 1 a 2 grs de heces con un aplicador de madera se mezcló haciendo una suspensión homogénea; con el mismo aplicador fueron retiradas las fibras de fragmentos gruesos; posteriormente se colocó un cubre objeto de 22 mm X 22 mm y con la ayuda de un microscopio compuesto (ZEISS de México) se observó con los objetivos de 10 y 40X.

### Descripción de la técnica para coproparasitoscópico por concentración (CPSC):

Se hizo una suspensión homogénea con 1 a 4 grs de materia fecal y 10 ml de agua destilada, la cual se pasó a través de una gasa, colocada sobre un embudo; colectando la suspensión directamente sobre un tubo de ensayo (13 mm X 10 mm), centrifugándose a una velocidad de 850 rpm, durante un minuto, en una centrifuga (Beckman modelo Tj-

6R, USA), el sobrenadante fue decantado y el sedimento se suspendió en agua; la centrifugación se repitió hasta obtener un sobrenadante claro; siendo posteriormente agregados 3 ml de solución de sulfato de zinc (MERK, México S.A), con una densidad de 1.180° Baumé, se homogenizó y se llenaron los tubos hasta 0.5 cm por debajo de los bordes y se centrifugó a una velocidad de 850 rpm durante un minuto. Con una asa nicromo (3 mm de diámetro) flameada, se recogió la muestra de la película del menisco en dos o tres ocasiones sucesivas depositándola en un portaobjetos (75 mm X 25 mm), se agregó una gota de lugol parasitológico homogeneizando con el aplicador, después se tomó un cubreobjetos el cual fue colocado sobre la preparación; haciendo la observación en un microscopio compuesto (ZEISS, de México) utilizando los objetivos de 10 X 40 X.

#### DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIAMIBIANOS:

Para la detección de anticuerpos antiamibianos en muestras de saliva y suero de los individuos en estudio se utilizó la técnica inmunoenzimática de ELISA (22). Esta fue realizada utilizando anticuerpos anti-IgA e IgG humana acoplados a la enzima peroxidasa producidos en cabra (Zymed laboratories Sn Fco. CA, USA).

La detección de anticuerpos anti-*E.histolytica* se realizó en muestras de saliva y suero de los individuos incluidos en el estudio.

Para la realización de esta técnica se emplearon tiras con 12 pozos removibles para microtitulación, a los cuales se acoplaron 1 µg de antígeno insoluble de amiba por pozo suspendido en solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH 9.6, colocando 50 µl por pozo de esta suspensión. Se secaron a 37°C por 2:30 hrs. En el momento de su utilización los pozos se hidrataron lavándose una vez con una solución de fosfatos (PBS) 0.02 M pH 7.2 a la que se le añadió 0.5% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis Mo. USA) este procedimiento de lavado se utilizó durante todo el ensayo.

Posteriormente los pozos se bloquearon con PBS-Leche semidescremada al 5% (Svelty Nestlé de México S.A. de C.V.), incubando toda la noche a 4°C. A continuación y previo lavado de los pozos, se adicionaron 50µl de la muestra y se incubaron durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente, los pozos se lavaron y se añadieron con 50 µl de los anticuerpos conjugados a peroxidasa anti-IgG o anti-IgA humanos

(ZYMED Laboratories CA, USA) a una dilución de 1:1000 en PBS-BSA-Tween (0.5%) para incubar nuevamente durante 60 minutos. Dichos anticuerpos se utilizaron a las diluciones que previamente habían dado lecturas de D.O. a 490 nm similares a cuando se probaron con concentraciones iguales de las inmunoglobulinas respectivamente. Por último se añadieron 50 µl del sustrato 10 ml de solución amortiguadora e citratos 0.1 M pH 4.5, adicionada de 10 mg de O-fenilendiamina y 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (MERCK de México), la reacción se dejó transcurrir hasta observar la aparición de color y se paró después de 2 minutos añadiendo 200 µl H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1M (MERCK de México) por pozo. Las tiras se leyeron en un analizador de ELISA a una longitud de onda de 490 nm (Biokinetics Reader-Biotek Instruments).

#### DETECCION DE ANTICUERPOS EN SALIVA:

Para la detección de anticuerpos IgAs antiamebianos en las muestras de saliva, hubo necesidad de cuantificar previamente la IgA total en cada muestra, con el objeto de estandarizarlas a una misma concentración de IgA. La cantidad total seleccionada fue de 50µg/ml para cada muestra.

Los anticuerpos antiamebianos fueron detectados por la técnica de ELISA, usando como antígeno un extracto de *E.histolytica* HM1:IMSS. Para revelar la reacción Ag-Ac se utilizaron 50 µl de la dilución del anticuerpo conjugado a peroxidasa (anti-IgA humana); posteriormente se agregaron 50 µl por pozo de una solución de O-fenilendiamina (1 mg/ml) en un amortiguador de citratos (0.1 M pH 4.5) la reacción se detuvo después de 2 minutos con H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1M. La densidad óptica (DO) fue leída en un microlector de ELISA a 490 nm.

#### RECURSOS HUMANOS:

En el trabajo participaron un médico residente de 4º año del servicio de medicina interna, una enfermera general del servicio de urgencias adultos, dos coordinadoras de tesis, personal de laboratorio clínico y demás personal administrativo.

## RECURSOS MATERIALES:

El material de trabajo constó de computadora, hojas de papel, tubos cónicos para coleccionar saliva, tubos de vidrio para muestras de sangre, frascos de cristal para la colecciona de materia fecal, una centrifuga (Beckman modelo Tj-6R, USA), un microscopio compuesto (ZEISS de México), cubreobjetos, portaobjetos, tiras de 12 pozos removibles para microtitulación, pipetas, micropipetas, reactivos químicos para estudios de laboratorio además de un microlector de ELISA (Blokinec Reader-Biotek Instruments).

## RESULTADOS:

### Características de los grupos estudiados:

La descripción de las características sociodemográficas de los grupos control y de pacientes con absceso hepático amibiano se muestran en la tabla 1, en donde se puede observar la semejanza en la distribución de la mayoría de las variables estudiadas, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, a excepción de la variable relacionada con los hábitos higiénicos.

### SEGUIMIENTO:

Durante la primera fase del estudio los grupos estudiados se siguieron durante 12 meses, hasta este punto se consideró logrado en el 100% de los casos tomando en cuenta que se obtuvieron al menos una muestra de heces cada tres meses en cuanto al suero se obtuvo en el 72.7% y las muestras de saliva en el 99.6%.

Después de los 12 meses que fué el período comprometido de estudio con los voluntarios el 50% abandonaban el estudio por diversas razones, sin embargo, nueve individuos aceptaron continuar con el estudio, por espacio de 12 meses más, a los 36 meses se pudieran estudiar 2 individuos, 3 completaron un ciclo de seguimiento de 60 meses y dos de 72 meses.

### ANALISIS COPROPARASITOSCOPIICOS:

Al inicio del estudio se realizaron los estudios coproparasitoscópicos como parte de la batería de análisis de laboratorio y gabinete que permitieron el diagnóstico de absceso hepático amibiano, en esa ocasión solo 1 de los 18 pacientes incluidos en el estudio tuvieron quistes de *E.histolytica/E.dispar* en las heces (5%) quien dejó de excretar quistes después de completar su tratamiento antiamibiano.

El resto de los voluntarios, tanto del grupo control no parasitados como los individuos que tuvieron absceso hepático amibiano no presentaron reinfección intestinal por el parásito ni sintomatología compatible con amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano durante el resto del estudio.

## DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgAs ANTIAMIBIANOS EN LAS MUESTRAS DE SALIVA.

En la figura se muestran los resultados obtenidos en el ELISA para detección de IgAs en muestras de saliva. En dicha figura se observa que al ingreso al estudio el 100% de los individuos con absceso hepático amibiano, muestran niveles de anticuerpos por arriba de la línea de corte establecido previamente como se indica en la sección de material y métodos, los cuales se mantienen elevados hasta los 12 meses de observación, la evolución que cada individuo tuvo en los niveles de anticuerpos secretores a través de esos primeros 12 meses de observación se muestran en la figura 2 en donde se puede apreciar que dichos niveles se mantienen altos (por arriba de la línea de corte) durante esos primeros 12 meses. Posteriormente y tomando en cuenta el número de individuos que se siguieron hasta los 24 meses (9 individuos) quisimos ver como se comportaban en su respuesta de anticuerpos secretores, encontrando que a partir de los 18 meses los niveles empiezan a bajar para que a los 36 meses en la mayoría de los individuos se encuentren por abajo de la línea de corte (Figura 3). La proporción de individuos que permaneció con anticuerpos secretores antiamebianos elevados a los 24 meses fue del 33.3% (3/9). Siete individuos convinieron en continuar hasta los 36 meses, cuando todos dejaron de producir niveles de anticuerpos por arriba de la línea de corte, a partir de este período el resto de los voluntarios, 5 de los cuales se estudiaron a los 60 meses y dos a los 72 meses continuaron disminuyendo sus niveles de anticuerpos significativamente (figura 3).

## DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS ANTIAMIBIANOS IgG

En cuanto a la respuesta de anticuerpos IgG antiamebianos en los individuos estudiados (Fig. 4) observamos que los niveles séricos de IgG específica se encuentran significativamente elevados con respecto al grupo de individuos controles. En este caso nuevamente el 100% de los pacientes con AHA ingresaron al estudio con títulos altos de anticuerpos y los mantuvieron así durante los primeros 12 meses de observación. La evolución de la respuesta de anticuerpos circulantes antiamebianos hasta los 12 meses se muestra en la figura 5, donde es claro que todos los individuos mantienen sus niveles de



anticuerpos por arriba de la línea de corte. En la figura 6, se muestra la evolución correspondiente a la respuesta de anticuerpos circulantes de los 9 pacientes que accedieron a continuar con el estudio, en este caso se puede observar que la IgG anti-amibiana disminuye a partir de los 24 meses hasta hacerse negativa al rededor de los 60 meses.

En la tabla 2, encontramos un resumen de los datos sobre los voluntarios que se pudieron seguir después de los 12 meses y la proporción de ellos que mantuvieron niveles de anticuerpos significativamente elevados, como se puede observar.

## DISCUSION:

Tomando en cuenta los datos obtenidos previamente ( 23,24) en cuanto a característica sociodemográficas de grupos o cohortes de pacientes con absceso hepático amibiano, u otras formas de a mibiasis invasora como la amibiasis intestinal o la infección asintomática por *E.histolytica/E.dispar* en nuestro país, debemos decir que nuestros datos coinciden nuevamente en que la gran mayoría de las viables sociodemográficas estudiados no parecen ser determinantes para la condición de infección sin embargo, la ausencia del hábito de lavado de manos después de ir al baño y antes de consumir alimentos así como la costumbre de ingerir alimentos en la vía pública son factores de riesgo para adquirir la infección o en dicho caso la enfermedad. Por otro lado, en la mayoría de las enfermedades infecciosas gastrointestinales se ha podido documentar la importancia de la accesibilidad del agua para uso doméstico, el lavado de manos y la eliminación adecuada de excretas como factores que inciden en la determinación de la transmisibilidad de las enfermedades infecciosas gastrointestinales (25,26).

En cuanto a los individuos reclutados, todos llegaron al servicio de urgencias con síntomas claros de un probable absceso hepático amibiano el cual se diagnosticó sonográficamente y a través de la determinación de anticuerpos antiamebianos circulantes elevados, en ninguno de los casos fue necesaria la evacuación del absceso, para confirmar la presencia de trofozoítos, sin embargo la respuesta al tratamiento antiamebiano con Metronidazol permitió confirmar la etiología del proceso. Cabe mencionar que dentro del grupo de pacientes se incorporó uno con el antecedente de haber tenido dos abscesos amebianos previos (1995 y 1997) los cuales fueron atendidos en el mismo hospital donde se pudo corroborar el hecho con los documentos de su expediente clínico.

En cuanto la respuesta de anticuerpos séricos no es de sorprender el hallazgo de niveles elevados de anticuerpos de la clase IgG en el suero de los pacientes estudiados, ya que se sabe desde hace más de tres décadas que dichos anticuerpos aparecen muy temprano en la historia natural de la enfermedad y suelen persistir durante meses y años (27) en nuestro caso hemos querido intentar un estudio a largo plazo con el objeto de demostrar la persistencia de tales anticuerpos después de evidenciar posibles contactos o

reencuentros con el parásito los cuales pudieran ser documentados a través de la detección del microorganismo en las heces ó en una nueva forma de amibiasis invasora.

Aparentemente, y a pesar del escaso número de individuos que se pudieron seguir después de los 12 meses de haber tenido el AHA (9/18) estos individuos no se reinfectan y solo el 50% de los 9 individuos mantuvieron su respuesta de anticuerpos específicos elevada hasta los 24 meses de seguimiento.

Los datos de individuos con títulos de anticuerpos elevados después de 3 a 10 años de haber curado de un AHA pudieron deberse a reinfecciones no documentadas (28).

Por otro lado, llama la atención que los niveles de anticuerpos secretores se encuentren también elevados durante tiempos tan prolongados, este hecho no se había documentado hasta muy recientemente (29) ya que se había mencionado que los anticuerpos IgAs antiamebianos en heces de niños con disentería amebiana se elevaban en los primeros días, sin embargo, dejaban de detectarse después de 3 semanas de tratamiento (30).

Estas diferencias podrían deberse a las técnicas de detección de los anticuerpos o a la muestra utilizada en el análisis ya que la presencia de potentes proteasas microbianas pueden alterar las determinaciones en muestras fecales, no así en el caso de anticuerpos detectados en muestras de saliva, la cual por otro lado, sabemos que forma parte de las secreciones producidas por el sistema inmune asociado a las mucosas (31,32), ya que las células B productoras de IgA sensibilizadas en el intestino son capaces de migrar a las glándulas salivales donde se diferencian a células plasmáticas productoras de IgA (33).

Es evidente que la persistencia de anticuerpos secretores en la saliva de los individuos con antecedentes de AHA va más allá de los 12 meses, aunque después de este periodo decae importantemente, al parecer de manera más rápida que lo que sucede en el caso de los anticuerpos circulantes, es posible que exista en el caso del AHA la posibilidad de que a pesar de no haber contacto con el parásito (demostrable por lo menos en este caso posterior a la enfermedad, la estimulación de la respuesta de anticuerpos se dé a través de la persistencia de antígenos de *E.histolytica* en el sistema reticulo endotelial del huésped como ya ha sido reportado previamente (18).

A pesar de la evidencia de una respuesta de anticuerpos contra el parásito tanto a nivel local como en el sistémico, no queda claro que papel juegan estos anticuerpos en la resistencia o la reinfección o si esta respuesta inmune tiene dentro de sus características mantener una memoria inmunológica eficiente y duradera. De hecho nuestro propósito central fue el poder tener evidencia directa de estas dos posibilidades, ya que la población estudiada (casos y controles) pertenecen a una zona geográfica común y como se observó (Tabla 1) aparentemente no hay grandes diferencias en sus características sociodemográficas, por otro lado, en ambos casos no se detectaron cambios conductuales que nos hagan pensar en la modificación de los factores de riesgo detectados como significativos (hábitos higiénicos), de manera que pudiéramos pensar en la probabilidad de la reexposición o reinfección por el parásito en los individuos con AHA y por otro en la posibilidad de infección del grupo control durante el tiempo de observación. Esto habría permitido el poder observar una reestimulación de la respuesta inmune a nivel local o sistémica sin infección establecida, o en el caso del grupo control que sabemos que no tienen anticuerpos anti-amibianos pudiera darse una proporción mayor de individuos infectados (más que en el grupo de AHA) si en verdad como pensamos, dichos anticuerpos tuvieran un papel en la resistencia a la infección, desafortunadamente esto no ocurrió así, de manera que después de este tiempo de observación no podemos concluir con certeza, que los anticuerpos locales o sistémicos participen directamente en la resistencia a la infección, pero tampoco podemos descartar de manera contundente su muy probable participación.

## BIBLIOGRAFIA:

1. T.F.H, Jackson. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species, Clinical, epidemiological and serological evidence. Int J Parasitol. 28. 1998;181-186.
2. Losch FA. Massive development of amebas in the large intestine, Am J Trop Med Hyg 1875;24:383-97.
3. Select Committee. Amebiasis Outbreak in Chicago: Report of a Special Committee Jama 1934; 102:369.
4. Le Maiste CA, Sappendfield R, Cutbertson C. et al. Studies of a Water-borne outbreak of amebiasis; South Bend, Indiana. Am J Hyg. 1956;60:30-45.
5. I.Montfort, R.Pérez-Tamayo. Is phagocytosis related to virulence in *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903? Parasitology today. 1994;7:271-273.
6. Celis A. Alava J. Patología de la pobreza. Rev Med Hosp Gen Mex. 1970;333-371.
7. Brumpt E. Etude sommaire de "*Entamoeba dispar* n.sp. amibe a kystes quadrenuclees parasite of homme". Bull Acad Med Paris, 1925;94:943.
8. Sargeant PG. Y Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non pathogenic intestinal amoeba in man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73-225.
9. Clark GC. Diamond LS. *Entamoeba histolytica* method for isolated identification. Exp Parasitol. 1993;77:450.
10. González A, Haque R., Rehman T. Aguirre A., Jaramillo C., Castañón G., Hall A., Guhl F., Ruiz G., Washurst. D.A. Monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive. Clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. J. Clin Microbiol. 1992; 11:2807-2813.
11. The Expert Committee meeting on the differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* WHO PAHO-UNESCO. Colegio Nacional, México, D.F. Enero de 1997.
12. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infec Dis. 1986; 8-228.

13. Alvarez Alva R y de la Loza-Saldivar A. Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social en la República Mexicana. Arch Invest Med (Méx). 1971 2 (supl:1) 327.
14. Diamond LS, Harlow R, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978;72:431.
15. Gutiérrez G. Muños O. Epidemiology of amebiasis. In amebiasis: Infection an disease by *Entamoeba histolytica*. Ed. Kretschmer R. pág. 173 Press INC: 1990.
16. Abd-Alla M, Jackson H, Gathiram V, Ravdin J. Differentiation of patogenic *Entamoeba histolytica* infections from non-pathogenic infections by detection of galactose inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. J Clin Microbiol 1993;31:2845-2850.
17. Jetter A. Walderich B. Britten D. Meate Ö, Gösal V. Burchard GD, Ackers J. An Epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E.dispar* infection in easters turkey using a colorimetric polimerase Chain Reaction. 1997;28:319-321.
18. Krupp IM. Powell J. Comparative study of the antibody response in amebiasis persistence after successful treatment. Am J Trop Med Hyg. 1971;20:421.
19. Haque R. Ali I.K.M. and Petri WA., Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg, 1999; 60: 1031-1034.
20. Del Muro, R., Acosta E., Merino E. Glender W., Ortíz-Ortíz L. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. J Infect Dis 1990;162:1360-64.
21. Faust, EC. Russell, P.R. y Jug RC: Clinical Parasitology. Lea y Febiger ed. Philadelphia. Pág: 783,1970.
22. Ortíz-Ortíz L, Ximénez C, Mendoza F, Michalak C, Melendro EI, Olivia A. *E.histolytica*: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. Exp Parasitol. 1986;61:390.
23. Valenzuela O. Estudio longitudinal de cohortes de individuos infectados con *E.histolytica/E.dispar*. Tesis. 1998.
24. Valdez E. Antigenos HLA Asociados al Estado de Portador Asintomático de *E.histolytica/E.dispar* en Mestizos Mexicanos. Tesis. 1997.

25. Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of personal and domestic hygiene. Bull WHO. 1984;62:467-476.
26. Ersey SA, Feachem RG, Hughes JM. Interventions for the control diarrhoeal diseases among young children: Improving water supplies and excreta disposal facilities. Bull WHO. 1985;63:757-772.
27. Petterson M, Healy GR, Shabot JM. Serologic testing for amoebiasis. Gastroenterology. 1980;78:136-41.
28. Krupp IM. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am J Trop Med. 1970;19:57-60.
29. Kelsall BL, Jackson TGFH, Gathiram SB, Vaithilingum SM, Pearson RD, Ravdin JL. Secretory immunoglobuline antibodies to be galactose-inhibitable adherence in the saliva of patients with amebic liver abscess. Am J Trop med Hyg. 1994;51:454-459.
30. Martínez-Cairo S, Garab A, Muñoz O. Copro-antibodies in intestinal amebiasis. Arch Invest Med (Méx). 1979;10:121-124.
31. Mestecky J, McGhee JR, Arnold RR, Michaleck SM, Prince SJ, Babb JL. Selective induction of an immune response in human external secretions by injection of bacterial antigen. J Clin Invest. 1978;61:731-737.
32. Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell MW, Moldoveanu Z, McGhee JR, Mestecky J. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in human. Proc Natl Acad Sci. 1987;84:2449-2453.
33. Quiding M, Nordstrom I, Larson L, Anderson G, Russel MW, Johnson R, Svennerholm AM, Hansson LA, Kilander A, Ganstrom G, Friman W, Holgrem J, Czerkinsky C. The cellular basis of intestinal immunity in humans. Tsuchiya M, Nagura H, Hibi T. ed *frontiers of Mucosal Immunology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 225-259, 1991.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

TABLA 1. Descripción sociodemográfica de la población estudiada.

CARACTERISTICAS	AHA n=18	NEG n=104	PROMEDIOS
Edad ± D.S.	43.07 ± 15.75 n (%)	40.3 ± 14.1 n (%)	> 0.05 +
Sexo femenino	3 (15.0)	84 (80.7)	> 0.05*
Escolaridad (primaria o menos)	0 (0)	59 (56.7)	>0.05*
Amas de casa	1 (5.0)	37 (35.5)	>0.05*
Malas condiciones de la vivienda	1 (5.0)	6 (5.7)	>0.05*
Bajo nivel socio- económico	1 (5.0)	22 (21.1)	>0.05*
Mala higiene	14 (70.0)	51 (49)	< 0.01*

D.S. Desviación estándar

\*Prueba de  $X^2$

+ Prueba de t de Student



TABLA 2. Proporción de individuos con anticuerpos antiamibianos  
Séricos y secretores positivos.

MESES	<u>Anticuerpos antiamibianos</u>	
	Séricos (IgG)	Secretores (IgAs)
0	9/9 (100%)	9/9 (100%)
6	9/9 (100%)	9/9 (100%)
12	8/9 (88.8%)	9/9 (100%)
24	5/9 (55.5%)	3/9 (33.3%)
36	4/7 (44.4%)	0/7 ( 0% )
60	2/5 (40%)	0/5 ( 0% )
72	0/2 ( 0% )	0/2 ( 0% )

Los niveles de anticuerpos antiamibianos se consideran como positivos a aquellos cuyo valor de D.O. a 490 mM. están por arriba de la línea de corte, calculada como la media de la D.O. obtenida en el grupo control más 2 desviaciones estandar (D.O.= 0.555 para ambas clases de inmunoglobulinas)

Figura 1. SEGUIMIENTO DE IGA<sub>s</sub> EN PACIENTES CON AHA  
(PRIMERA FASE)

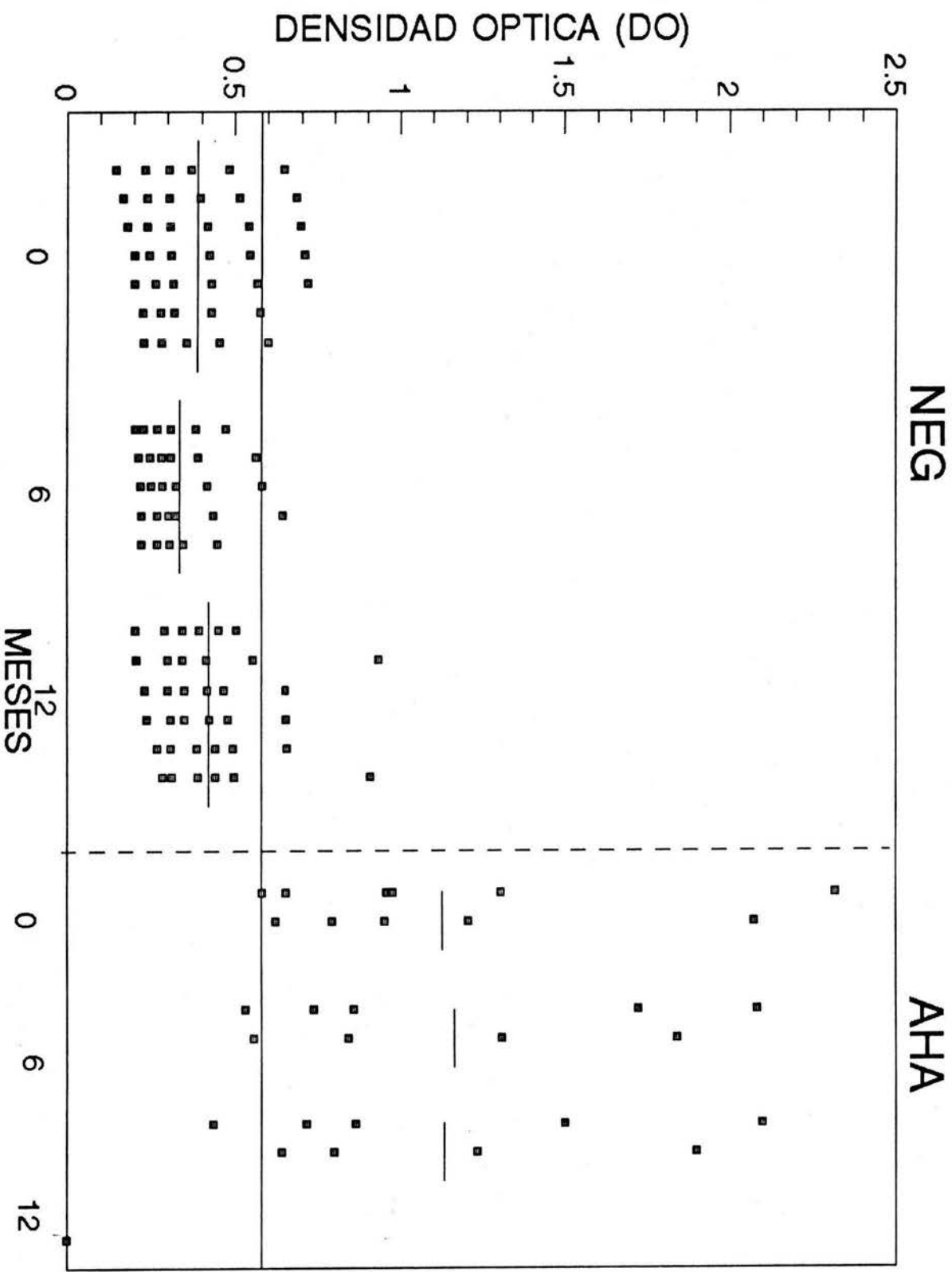


Figura 2. SEGUIMIENTO DE IGA5 EN PACIENTES CON AHA  
(PRIMERA FASE)

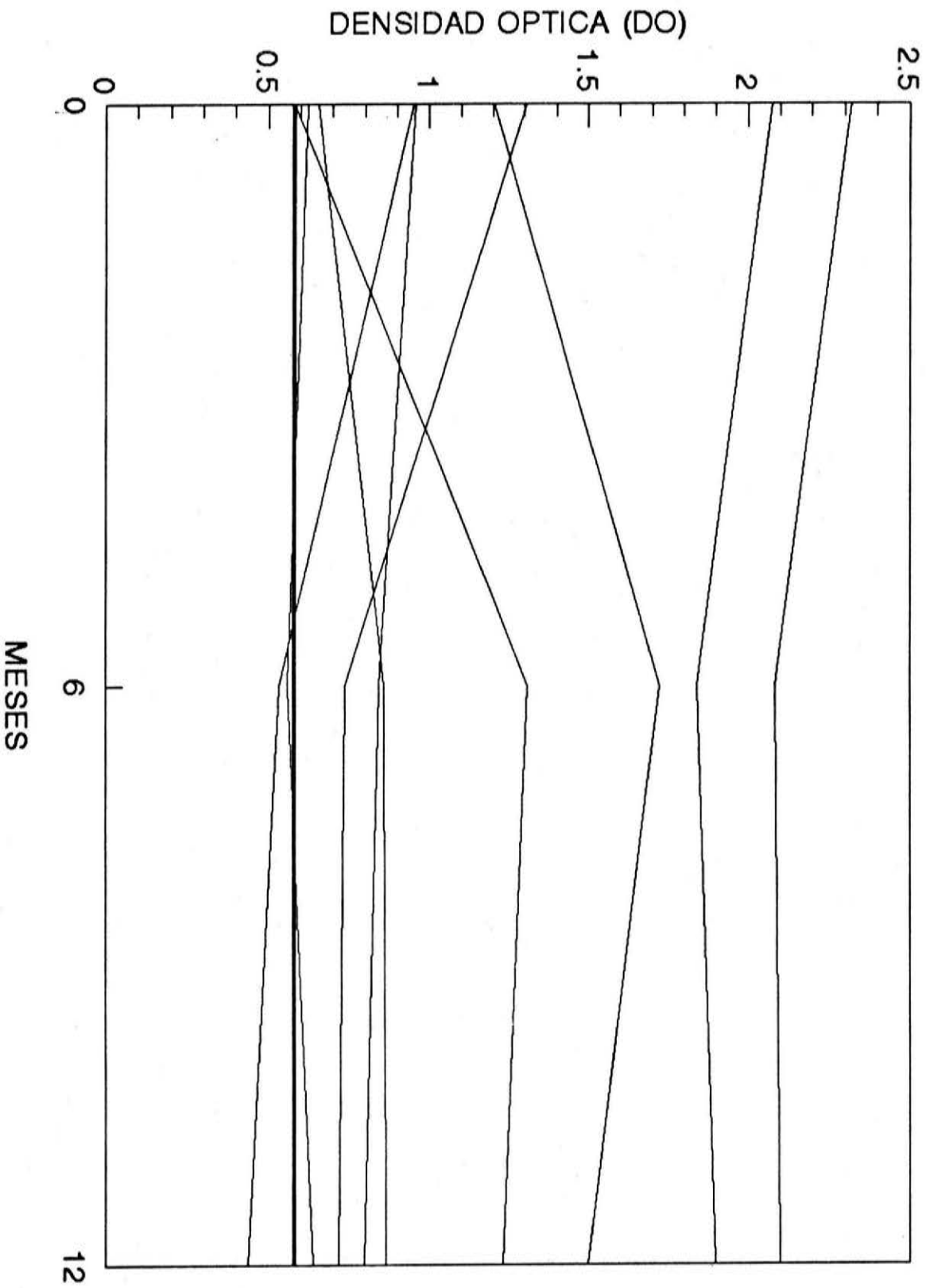


Figura 3. DENSIDADES OPTICAS DE IGA EN SALIVA

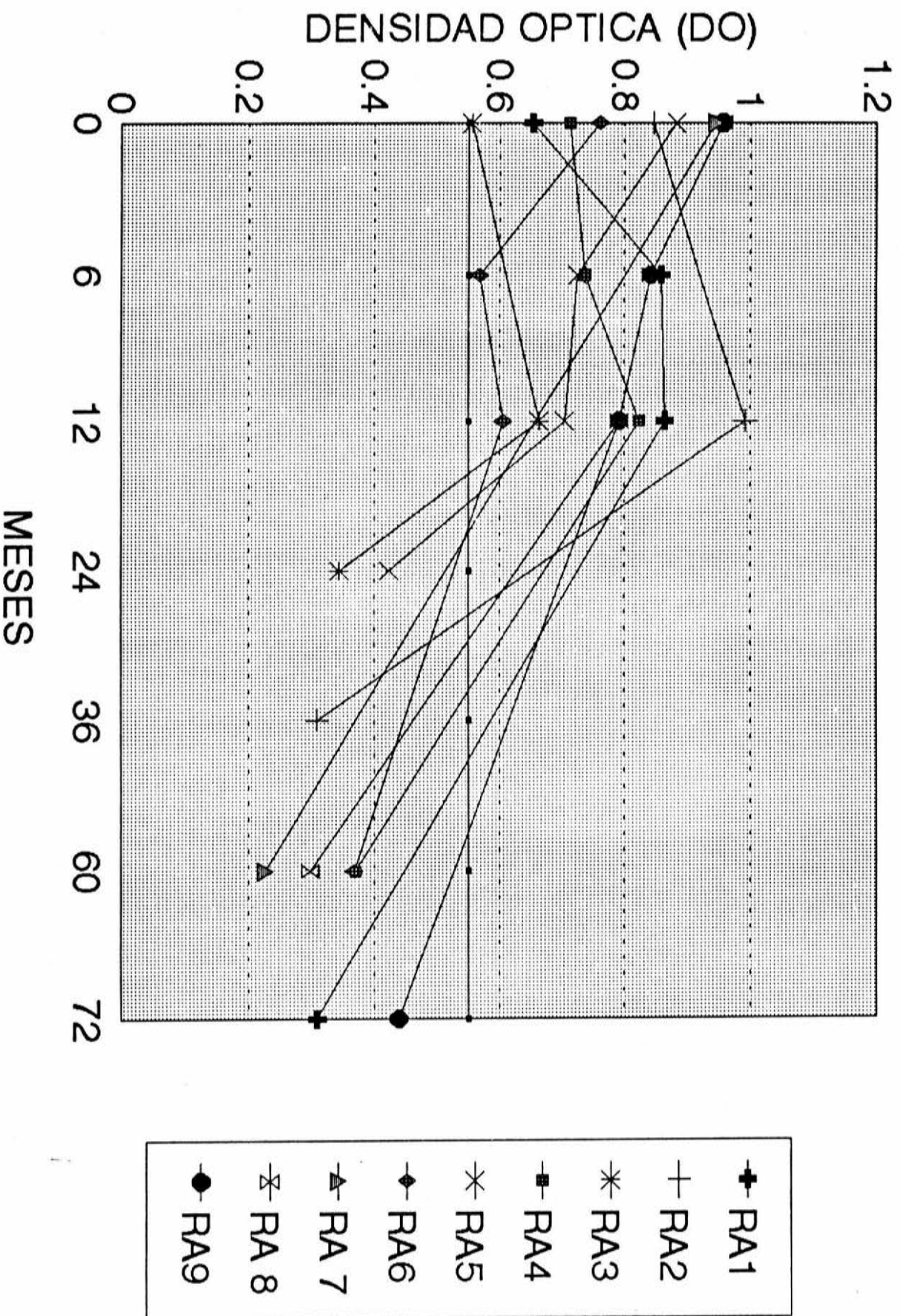


Figura 4. SEGUIMIENTO DE IGG EN PACIENTES CON AHA  
(PRIMERA FASE)

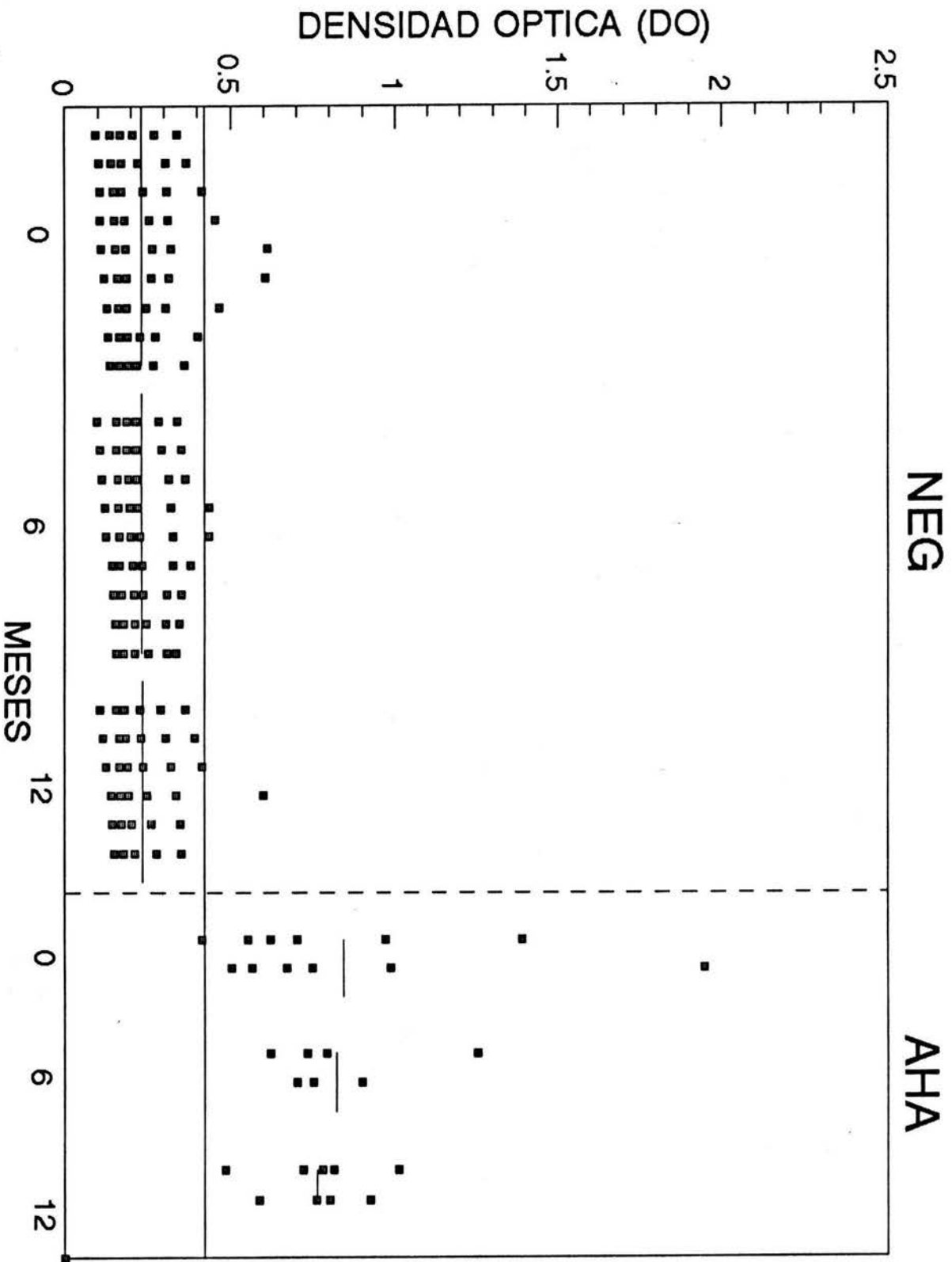


Figura 5. SEGUIMIENTO DE IGG EN PACIENTES CON AHA  
(PRIMERA FASE)

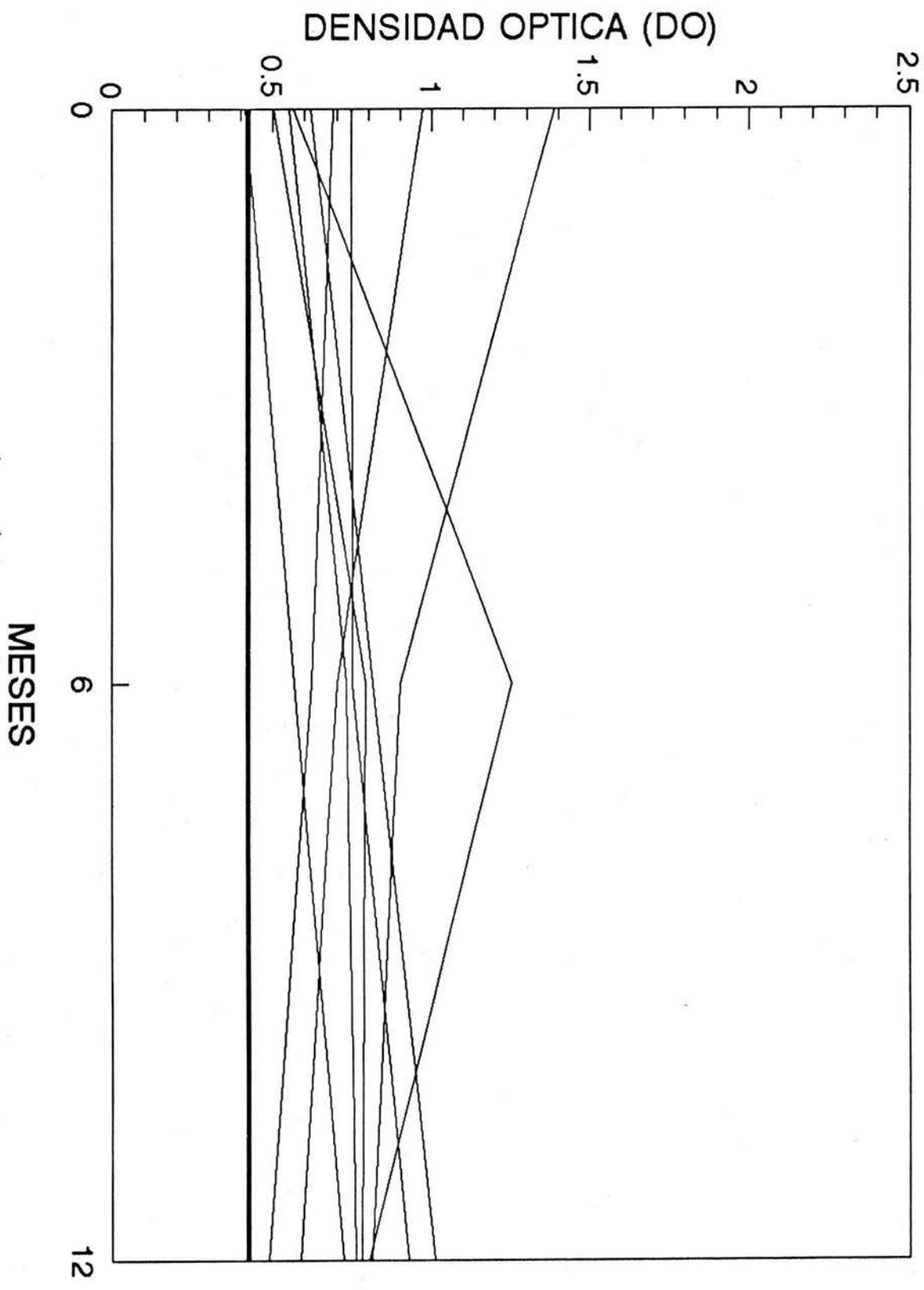


Figura 6. DENSIDADES OPTICAS DE IgG EN SUERO

