

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
UNAN-LEON**



*Identificación de Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar
empleando técnicas enzimáticas y moleculares en pacientes con
diarrea en tres centros de salud de León, 2002.*

Victoria Isabel Altamirano Medina.

León, Enero 2003

Agradecimientos Especiales

Agradezco infinitamente a las todas las personas que dedicaron sus conocimientos su valioso tiempo, y paciencia que hicieron posible la realización y defensa de este trabajo de investigación. Con especial mención a los siguientes docentes y compañeros de trabajo:

A mi Tutor: M.Sc. Byron Leiva Torres

A mi Asesor: M.Sc. William Morales Garcia

M.Sc. Edelma corrales Lanuxa

M.Sc. Aleyda Teller Sierra

Dr.. Efrén Castellón Cisneros

Dedicatoria

A mis seres queridos por la paciencia, el tiempo y sacrificio dedicado para la culminación de este estudio.

A Dios por iluminar mi camino.

*A mis queridos hijos: Arnolde Medardo Sirias Altamirano y
Enma Rosa Sirias Altamirano.*

Al padre de mis hijos:

Lic. Arnolde Sirias Sampson. Por sus palabras de aliento para seguir adelante y por su comprensión y apoyo.

A mis padres: Medarde Martin Altamirano P. (q.e.p.d.)

María Dora M. Vda de Altamirano.

A mis hermanas por todo su apoyo y colaboración.

Gracias

Identificación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* empleando técnicas enzimáticas y moleculares en pacientes con diarrea en tres centros de salud de León Nicaragua. 2002.

RESUMEN

I. Altamirano¹, B. Leiva²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAN-LEON

²Universidad de Alcalá de Henares. Madrid-España.

La amebiasis es una enfermedad producida por el protozoo *E. histolytica* capaz de producir colitis amibiana y absceso hepático. Debido que la identificación de *E. histolytica* / *E. dispar* es todavía un problema en el diagnóstico de rutina ya que debe ser diferenciada de un grupo de protozoos que habitan en el lumen intestinal; se realizó el presente estudio para identificar *E. histolytica* y *E. dispar* en tres centros de salud de la ciudad de León. Los métodos de laboratorio empleados fueron: Examen microscópico, Triage y PCR. El examen microscópico nos permitió la identificación de los principales parásitos encontrando una prevalencia de *E. histolytica* / *E. dispar* de 5.2%, *Giardia lamblia* 18.6%. En el método enzimático Triage se encontró una prevalencia de infección de *E. histolytica* / *E. dispar* de 0.7%, *Giardia lamblia* 16.4% y *Trichiuris trichiura* 6.7%; demostrando este método mayor sensibilidad para la detección de *Giardia lamblia* y baja sensibilidad para *E. histolytica* / *E. dispar*. Al relacionar el método Triage con el examen microscópico en relación a *Giardia lamblia* se encontró una concordancia excelente, con un valor de Kappa = (0.920). En el PCR se encontró una prevalencia de infección para *E. histolytica* / *E. dispar* de 9%. Al relacionar el examen microscópico con el PCR se encontró que la microscopía detectó 7 *E. histolytica* / *E. dispar* de 12 que detectó el PCR, demostrando así una baja concordancia, con un valor de Kappa = (0.267), esto nos sugiere la baja sensibilidad de la microscopía y la alta sensibilidad del PCR en la detección de ambos parásitos.

INDICE

CONTENIDO	Pág.
Introducción	1
Objetivos	18
Material y Método	19
Procedimientos	20
Operacionalización de variables	24
Plan de Análisis	26
Resultados	27
Discusión	30
Conclusiones	32
Recomendaciones	33
Bibliografía	34

INTRODUCCIÓN

La amibiasis es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La infección generalmente compromete al colon, pero puede extenderse hacia otros órganos por vía hematogena, tales como el hígado y con menor frecuencia a los pulmones y el cerebro. Muy frecuentemente este protozooario se presenta en los humanos sin producir sintomatología; sin embargo, debido a su poder invasor *E. histolytica* siempre debe ser tratado como un patógeno potencial.

Clasificación taxonómica (1):

Phylum	:	Protozoa
Subphylum	:	Sarcodina
Superclase	:	Rhizopoda
Clase	:	Lobosea
Orden	:	Amoebida
Familia	:	Entamoebida
Genero	:	Entamoeba

AGENTE

Entamoeba histolytica emite pseudópodos a base de material protoplásmico locomotor; tiene dos formas o fases de desarrollo bien establecidas, el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto o forma vegetativa es irregular o ameboide, presentan membrana citoplasmática, citoplasma dividido en dos porciones, una externa hialina y trasparente, casi sin granulaciones, llamada ectoplasma, y una porción interna muy granulosa que contiene los organelos celulares, denominada endoplasma. El núcleo es esférico con un acumulo de cromatina pequeño y puntiforme en el centro, llamado endosoma o centrosoma el cual tiene una posición central, también presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, distribuida de forma más o menos homogénea. Los trofozoítos de las lesiones intestinales son grandes (diámetro entre 20 a 40 ul) Esta forma móvil habita en el colon y sobrevive poco tiempo fuera del organismo; muere rápidamente con el ácido clorhídrico y enzimas digestivas y por estas razones no son importantes en la transmisión de la enfermedad.

El quiste es la forma infectante, mide de 7 a 15 μ m. El quiste sobrevive en el suelo húmedo durante una semana por lo menos si la temperatura fluctúa entre 28 y 34 °C muy resistente al ácido clorhídrico y no muere con tratamiento de cloración, se han producido grandes epidemias al mezclarse las aguas potables con aguas negras. Los quistes mueren por ebullición, sequedad, exposición a la luz solar, calor y exposición al yodo.

Entamoeba histolytica es un protozoario con tres estructuras anatómicas principales:

1. **Membrana citoplasmática con dos capas.** Contiene más de una docena de proteínas antigénicas. Al interaccionar anticuerpos contra estas proteínas de superficie, el parásito moviliza rápidamente los complejos antígeno-anticuerpo hacia su extremo posterior y los elimina del medio. Esto puede indicar que el parásito elude la respuesta inmune humoral del huésped.
2. **Citoplasma.** Contiene numerosas vacuolas, gránulos de glucógeno y acúmulos de ribosoma. No tiene aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico o microtúbulos.
3. **Núcleo.** Con cromatina periférica y endosoma central tiene también una cantidad de enzimas que intervienen en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

E. histolytica es un germen microaerófilo, que su energía la obtiene por la conversión de glucosa a piruvato y que, aunque carece de mitocondrias, sí tiene el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Tiene cadena respiratoria que le permite transferir electrones de oxígeno. El trofozoíto puede sobrevivir en una atmósfera con baja tensión de oxígeno, (2).

ENTAMOEABA HISTOLYTICA / ENTAMOEABA DISPAR

Entamoeba histolytica puede comportarse de dos formas diferentes: una no patógena que encontramos en las personas infectadas que no presentan ninguna sintomatología y que se conocen como portadores asintomáticos; la otra forma es la patógena que es la responsable del daño ocasionado al huésped y por lo tanto responsable de las manifestaciones clínicas de las diferentes variantes de la amibiasis.

En 1925 el destacado parasitólogo, doctor Brumpt, planteó la posibilidad de la existencia de dos protozoarios diferentes en su comportamiento, uno patógeno y otro no, pero morfológicamente idénticos y les dio por nombre: *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. Posteriormente, en los últimos años se retomó esta idea y a la fecha se considera la existencia de esta última especie como la responsable de la infección no patógena de este protozoo y por lo tanto responsable de los portadores asintomáticos.

A la fecha se cuenta con bibliotecas genómicas con las que se han construido sondas de ADN y ARN altamente específicas, gracias a las cuales se ha logrado demostrar diferencias entre cepas distintas genéticamente dentro de una especie dada. En base a lo anterior se ha concluido que *Entamoeba histolytica* tiene dos subespecies, una capaz de producir enfermedad y otra que se comporta como un microorganismo no patógeno; en términos generales hoy se acepta la existencia de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* (retomando el nombre y la consideración de protozoarios diferentes que planteó Brumpt en 1925); esta última en realidad debiera denominarse *Entamoeba histolytica dispar*, o variedad de especie *dispar*, sin embargo aún no es posible descartar totalmente la posibilidad de que exista un fenómeno biológico llamado conversión fenotípica que contribuiría a la virulencia del protozoo; en realidad esto sigue siendo motivo de investigación con el objetivo de demostrar esta posibilidad, especialmente en grupos de investigación de varios países, entre los que destacan México e Israel, (3,4).

ZIMODEMOS

Otra manera de tratar de diferenciar entre amebas patógenas y no patógenas ha sido la comparación de zimodemos, que son corrimientos electroforéticos de proteínas de los trofozoítos. Los diferentes patrones electroforéticos (zimodemos) se han caracterizados a partir de cuatro enzimas involucrados en el metabolismo de carbohidratos de una población dada de amebas. Se han descrito 22 zimodemos, de los cuales 9 se han aislado de pacientes sintomáticos y 13 restantes se han encontrado en portadores sanos.(5).

CICLO BIOLÓGICO

Entamoeba histolytica como quiste se encuentra en el medio ambiente; por diferentes mecanismos llega a la boca de un individuo, se desenquista y deja libre un trofozoíto metacíclico, en la luz del intestino grueso; los trofozoítos se multiplican por fisión binaria, algunos se enquistan, y salen al medio con las heces. Los trofozoítos pueden permanecer en la luz del colon, o adherirse a la mucosa e invadirla, produciendo lesiones ulcerosa; se puede diseminar por vía sanguínea o por contiguidad a hígado, diafragma, vísceras, pared abdominal, etc. Por su mecanismo de transmisión la amibiasis pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por fecalismo.

EPIDEMIOLOGIA

La amibiasis se ha encontrado en forma universal desde Alaska hasta el sur de Argentina y desde Finlandia hacia Africa del Sur y Australia. Su distribución depende más de factores higiénicos que geográficos. Su mayor frecuencia se encuentra en zonas subtropicales o tropicales, en donde los cuadros clínicos son más graves; en las zonas restantes, la mayoría son portadores asintomáticos. Se ha estimado que aproximadamente 480 millones de la población mundial alberga *E. histolytica*. La prevalencia de *E. histolytica* es inversamente proporcional al mejoramiento de las medicinas sanitarias. La infección por *E. histolytica* es frecuente en ambientes muy poblados en donde las condiciones higiénicas son deficientes : En Estados Unidos se informa que entre el 1 y el 2% , en Colombia del 4 al 50%, en Argentina del 13 al

22%, en México durante mucho tiempo se manejó la cifra del 27%; sin embargo con la experiencia del laboratorio de Parasitología, se considera que la infección mundial es del orden del 15% y en México del 5 - 55%. En el año de 1970, la población mexicana menores de 16 años de edad tenían anticuerpos séricos contra *E. histolytica*. En una encuesta nacional serológica efectuada en 1974 se recolectaron muestras de 20.000 individuos (niños y adultos) de 46 comunidades de la república Mexicana encontrando que 95% tenían anticuerpos antiamebianos (lo que traduce amibiasis invasora, ya que despertó una respuesta inmune) el grupo más afectado fue el de niños de 5-9 años (6.84%). En las encuestas de tipo serológico se han encontrado sectores positivos para *E. histolytica* en cifras que fluctúan entre 5-13 %, cifra que representa el por ciento de individuos que desarrollan la enfermedad amibiana . En niños se observa en el 1.9% de los lactantes, 10.1% de los preescolares y 14.5% de los escolares. En niños que presentan diarrea con sangre, se ha encontrado *E. histolytica* como agente causal en el 19% de los casos en México en comparación con Brasil que ha sido hasta de un 60% . En los niños el 60% presentan lesiones intestinales y el 38.5 % lesiones hepáticas. La incidencia en preescolares , escolares y adultos es similar, siendo mayor en los lactantes. La invasión a tejidos intestinales es más frecuente en la infancia, mientras que la invasión en forma extraintestinal (hígado, lesiones pleuropulmonares, genitales y otros) es mayor en el adulto. Hay estudios en donde se muestra el índice de infección en familias de acuerdo a los miembros; así, se ha encontrado un 18% en familias hasta de 3 miembros y del 62% en familias con más de 10 miembros. Se ha puesto de manifiesto una estrecha relación entre la frecuencia de infección en los niños y otros miembros de la familia; así se ha observado un 0.6% en familias de escolares negativos a los exámenes coproparasitoscópico, mientras en los que se ha desarrollado la presencia de *E. histolytica* ha sido de un 20.7%. En las clases sociales más acomodadas, con buena higiene, la frecuencia de amibiasis fue del 15.2%, mientras que en los núcleos de población indigente fue del 50%.

Por su mecanismo de transmisión, la amibiasis pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por fecalismo, ya que las formas infectantes (quistes) se ingieren al llevar a la boca bebidas, alimentos, manos o fómites que contengan materias fecales de personas parasitadas con el protozoo, con sintomatología o sin ella; estos últimos (portadores) excretan quistes y son fuente de infección. Otro factor en la transmisión puede ser algunos hábitos sexuales que posibiliten el

contacto de heces con la boca. El reservorio de este protozooario es el hombre siendo así la única fuente de infección.(6, 7, 8).

PATOGENIA

Estudios patológicos muestran la actividad citolítica de la amiba la cual parece estar mediada por la secreción o acción de diversas toxinas y enzimas. Varias sustancias participan en el mecanismo del daño celular: citolisina, lipasa, colagenasas, proteasas, histoliticina, proteína formadora de poros y hemolisina, enterotoxinas; de estas últimas se han caracterizado dos componentes enterotóxicos, citotóxicos (cuya actividad podría estar dirigida a la activación de adenilato ciclasa con aumento resultante de AMPc, aparentemente sin evidencia de ADP ribosilación). El factor tóxico es una proteína (enterotoxina) con peso molecular de 30.000 daltons, (9).

E. histolytica esta constituida por un conjunto heterogéneo de amibas en cepas no patógenas y cepas patógenas y estas últimas con diferentes virulencias. Las características de las diferentes *E. histolytica* por medio de su patrón enzimático en electroforesis es a las que se llama Zimodemos, estudiada por Sargeant en países de varios continentes. Se han encontrado 18 zimodemos a nivel mundial de los cuales 11 se encuentran en México y de éstos 5 zimotipos han sido clasificados como patógenos, lo que podría explicar la elevada frecuencia de la enfermedad en nuestro país y por otra parte la prevalencia de amibiosis invasora en ciertas regiones geográficas a pesar de la distribución universal. Las cepas más virulentas se encuentran en regiones donde la amibiosis invasora es común mientras que las no patógenas tienden a mostrar una distribución mundial. Existe la posibilidad de que las cepas no patógenas se conviertan en patógenas y viceversa, según el tipo de flora bacteriana a la que se encuentren asociadas. Hay investigaciones sobre la acción de las bacterias sobre la virulencia de las amibas patógenas pero sin dilucidarse claramente. Hay cepas que producen lesiones destructivas en hígado e intestino sin haber bacterias; sin embargo la asociación con bacterias no patógenas aumenta la virulencia de *E. histolytica* en cultivo. No hay duda que las bacterias intestinales desempeñan un papel en lesiones intestinales pero en lesiones extraintestinales producen lesión destructiva sin haber bacterias,(10).

Existen varias propiedades de superficie que son diferentes en cepas patógenas y no patógenas. Estas propiedades en las cepas patógenas son: mayor capacidad de eritrofagocitosis, mayor susceptibilidad a aglutinar en presencia de la lecitina concanavalina A; ausencia de carga negativa de superficie que puede facilitar la interacción con células huésped, mayor efecto citopático sobre células en cultivo; capacidad de crecer en medios semisólidos y producir absceso hepáticos en animales de experimentación.

Las alteraciones en las células epiteliales que han tenido un contacto previo con *E. histolytica* son:

- a. acortamiento y desaparición de microvellosidades
- b. modificaciones en la permeabilidad de membrana
- c. formación de pequeñas discontinuidades o canales
- d. redondeamiento y desprendimiento de células epiteliales
- e. la célula ya dañada presenta aclaramiento de su citoplasma, edema de mitocondrias, dilatación del retículo endoplásmico rugoso y desaparición de la membrana plasmática.

Con relación a la patogenicidad de *E. histolytica*, el doctor Pérez Tamayo ha agrupado los mecanismos de agresión en factores de membrana: lisosomas, colagenasa y ameboporo y factores solubles: B-N - acetilglucosamina, inhibición de la quimiotaxis y citocinas. Como marcadores para identificar patogenicidad considera los siguientes: la producción de abscesos hepáticos en hámster, la aglutinación por concanavalina A, la adherencia a células epiteliales y a eritrocitos, la fagocitosis de células epiteliales y a eritrocitos y los zimodemos de tipos II, VI, VII, X, XI, XII y XIV, (11, 12).

El parásito no induce una respuesta inmunológica, pero cuando invade tejido desencadena una respuesta inmune tanto humoral como celular siendo la primera local y luego sistémica. En la respuesta humoral participan las inmunoglobulinas IgM, IgG, IgA, IgE, en la celular hay linfocitotoxicidad, actividad amebicida de macrófagos y polimorfonucleares. *E. histolytica* puede activar el complemento con lisis parasitaria resultante, pero no se ha descartado la posibilidad de que los productos del complemento activado pudieran participar en la inducción de la respuesta inflamatoria y en la hepatonecrosis observada en el hombre. Como resultado de la

invasión amibiana temprana, se ha encontrado aumento en el nivel sérico de anticuerpos específicos. De hecho, su prevalencia en una comunidad es indicador de la frecuencia de invasión y no sólo de infección. En los portadores asintomáticos o en sujetos sanos es frecuente demostrar anticuerpos circulantes contra *E. histolytica*, mientras que en el 90% o más de los pacientes con amibiasis hepática se han encontrado linfocitos sensibilizados inmunocompetentes y anticuerpos de la clase IgG, IgM, IgE, aunque en las heces de niños con enterocolitis amibiana se han identificado coproanticuerpos de la clase IgA e IgG. En un estudio hecho por Kretschmer con procedimiento de inhibición de hemaglutinación encontró coproanticuerpos en el 80% de los casos con disentería menos del 4% en pacientes con otras parasitosis intestinales y en sujetos sanos el 2%. Esta respuesta secretoria es de corta duración y pocas semanas después la proporción de positivos disminuye rápidamente. No se conoce el papel de los anticuerpos secretorios en la protección o patogénesis.

Se han encontrado anticuerpos circulantes, en particular IgM, IgG, aunque es más frecuente encontrar en mayor proporción IgG, debido probablemente a contactos previos con la ameba. En la amibiasis intestinal hay aparición de anticuerpos de predominio IgG, una semana después de la aparición de los síntomas (70% de los casos). En cambio en la amibiasis hepática el 100% de los casos tienen anticuerpos séricos. Por lo tanto, las pruebas serológicas están limitadas en la amibiasis intestinal.

Se tienen evidencias de mecanismos de evasión de la ameba tales como: movilización de los anticuerpos a su casquete polar los cuales pueden internalizar o fagocitar y persistencia de partículas glicoproteicas antigénicas durante su desplazamiento activo.

La respuesta inmunológica celular tal vez sea la que ofrezca una verdadera protección, aunque se le atribuya la responsabilidad de la formación del absceso hepático, (13, 14, 15).

PATOLOGÍA

Al implantarse los trofozoítos en la mucosa intestinal, la lesionan. En las etapas iniciales se observa reacción inflamatoria con edema, hiperemia y engrosamiento de la mucosa colónica.

La invasión de la mucosa inicia en el epitelio interglandular. El daño intestinal es más frecuente a nivel del ciego y rectosigmoides, en virtud de que en estos sitios el tránsito intestinal es menor y con ello se concentra mayor número de trofozoítos, algunos de los cuales llegan a invadir las paredes. En la amibiasis intestinal aguda, las lesiones características del colon son ulceraciones bien definidas separadas por segmentos de mucosa de aspecto normal. Las amibas generalmente se localizan en regiones de lisis epitelial y en el exudado superficial de las úlceras, compuesta de material necrótico, eritrocitos, bacterias, fibrina y escasas células inflamatorias.

La mayoría de las úlceras amibianas se presentan en la región cecal y rectosigmoidea del colon. En la colitis fulminante hay zonas extensas de necrosis. En la apendicitis amibiana hay inflamación, necrosis y ocasionalmente perforación. El ameboma es una lesión granulomatosa que abarca la mucosa y submucosa, con infiltración inflamatoria aguda o crónica; se localiza más frecuentemente en la pared del ciego o del rectosigmoide, (11, 16).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

La respuesta inmune ante la presencia e invasión de *E. histolytica* en el huésped humano se presenta tanto de manera humoral como celular. Se han detectado las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA, pero parece que este tipo de anticuerpos no establece una situación de protección contra las reinfecciones y, más aún, tampoco se ha demostrado una participación fundamental en la resolución de un caso agudo; su importancia, con lo que conocemos hasta la fecha, radica en su utilidad para establecer el diagnóstico de la amibiasis.

En estudios *in vitro* con amebas de cultivo, se ha demostrado que anticuerpos específicos contra el parásito llegan a inhibir el crecimiento de los protozoarios; también se ha logrado producir neutralización de su virulencia y hasta inhibir la eritrofagocitosis, así como inhibir la acción citolítica sobre las células de cultivos celulares al establecer contacto los trofozoítos con ellas. Con estas pruebas, podría estimarse que cuando menos potencialmente los anticuerpos sí podrían tener una participación en la resolución del problema invasivo de *E. histolytica*. Otras pruebas de trabajo experimental han demostrado que los trofozoítos también actúan frente a los anticuerpos para liberarse de ellos; se conoce el fenómeno, que se ha denominado formación de

casquete, mediante el cual un trofozoíto que tiene anticuerpos fijos en su superficie, rodeándolo, moviliza los anticuerpos hasta un punto de superficie y los elimina.

Los antígenos presentes en la superficie de *E. histolytica* seguramente son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune del huésped. La presencia de anticuerpos séricos antiamebianos en un individuo, se ha interpretado como evidencia de invasión tisular intestinal y extraintestinal. En la amibiasis se ha demostrado la presencia de coproanticuerpos en muestras de heces. La superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* es capaz de activar el complemento por la vía clásica, como por la vía alterna, (14, 17, 18).

RESPUESTA INMUNE CELULAR

La respuesta inmune celular participa en forma determinante en la resistencia a la infección con *E. histolytica*. La acción inmunosupresora de *E. histolytica* puede deberse a la capacidad citotóxica y fagocítica de los trofozoítos.

Otro nivel de la respuesta inmune, se ha demostrado la existencia de un producto de *E. histolytica*, que inhibe la quimiotaxis de las células de defensa, lo cual se considera podría ser un fenómeno biológico de gran importancia, como mecanismo de evasión del parásito, a la respuesta inmune. En función de la biología de las cepas de que se trate se presente la enfermedad y las complicaciones de la misma. Sin embargo, un hecho que choca frente a esta deducción es el paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana, el que, teóricamente por su estado de inmunosupresión, debería ser más susceptible para desarrollar abscesos hepáticos amebianos, sin embargo esto no sucede, ya que el absceso hepático amebiano en estas personas se presenta con la misma frecuencia que en población inmunocompetente.

No hay una correlación directa entre el daño y la cantidad de parásito, sería posible que la respuesta exagerada del huésped frente a *E. histolytica* sea el mecanismo para el incremento de la lesión, (14).

CUADRO CLINICO

La amebiasis puede manifestarse de diferente manera, que va desde formas asintomáticas hasta episodios de suma gravedad que llevan consigo alta mortalidad.

La amibiasis sintomática se clasifica en intestinal y extraintestinal.

Portador asintomático es el individuo que excreta quiste de *E. histolytica* en las heces sin que presente la enfermedad. Estos portadores sanos representan un papel importante desde el punto de vista epidemiológico, pues son la principal fuente de diseminación de la infección. La ausencia de síntomas se explica por que los parásitos viven en la luz del colon y no invaden la mucosa, en estos casos lo más probable es que la amibiasis sea debida a *E. dispar*, o por *E. histolytica*, cuando habita en la luz intestinal. En este caso la forma asintomática puede convertirse en sintomática.

Amebiasis intestinal aguda. Tiene como principal síntoma la presencia de gran número de evacuaciones intestinales, al principio abundantes y blandas y luego de menor volumen con moco y sangre. El paciente experimenta la necesidad de defecar con mucho esfuerzo, lo que constituye el síntoma llamado pujo. La evacuación al pasar por el ano, provoca una sensación de quemazón o desgarramiento. En el recto persiste un espasmo dolorosos que produce la necesidad de una nueva evacuación, la cual puede ser infructuosa; a este síntoma se le llama tenesmo. El número de evacuaciones diarias es variable generalmente de 6 ó más. La materia fecal contiene trofozoítos hematófagos, principalmente en el moco, pero están escasos o ausentes en los leucocitos.

Colitis amibiana fulminante. Es una amibiasis hiperaguda, o forma gangrenosa con sintomatología mucho más intensa, principalmente dolor abdominal, diarrea, tenesmo, vómito, anorexia y enflaquecimiento. Frecuentemente hay infecciones bacterianas sobreagregadas que agravan el cuadro intestinal. En estudios realizados en 450 niños se encontró que en el 28.9% de los casos se cultivó *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enteropatógena; y en el 3.3% de los pacientes se aislaron dos bacterias simultáneamente al hallazgo del protozooario, (24, 19, 20, 21).

Las complicaciones intestinales son:

- Perforación
- Ameboma
- Fistulización
- Amebiasis apendicular

Amebiasis extraintestinal se presenta en:

- Hígado
- Otras localizaciones como: pulmón, cerebro, riñón, etc
- Amibiasis cutánea.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico tiene dos objetivos fundamentales:

1. Demostrar el agente etiológico.
2. Demostrar la reacción del huésped.

El diagnóstico etiológico, tiene como finalidad la demostración directa ya sea de quistes o trofozoítos de *E. histolytica* o demostrar la presencia de la misma de forma indirecta a través de la identificación de anticuerpos específicos.

La mejor forma de identificar el género y especie de ameba es el examen microscópico, en frotis de materia fecal fijados y coloreados con hematoxilina férrica o con tinción tricrómica. La correcta identificación de los quistes se debe hacer en muestras teñidas con lugol.

La rectosigmoidoscopia es útil en la amibiasis intestinal y está indicada cuando no se ha demostrado la etiología. Ayuda en la observación y es el método más eficaz en la toma de una muestra para estudio. A la muestra del rectosigmoide se le debe efectuar tinción Acido periodico de shiff (PAS), ya que nos permite visualizar bien a los trofozoítos.

Las pruebas serológicas específicas para *E. histolytica* son:

1. Reacción de floculación
2. Inhibición de hemaglutinación (indirecta)
3. Contrainmunolectroforesis (CIEF)
4. ELISA
5. Precipitación en gel de agar
6. Inmunofluorescencia indirecta
7. Fijación de complemento
8. Inmovilización de trofozoítos

En general se puede decir que las pruebas serológicas son positivas en la amibiasis intestinal entre un 30 -54% y en el absceso hepático amibiano entre el 98-100 %.

La Reacción de floculación. Es una prueba cualitativa, de muy fácil ejecución e indica la presencia de anticuerpos humorales. Un resultado positivo no indica necesariamente enfermedad, ya que los anticuerpos detectados por esta prueba pueden permanecer durante 3 años como promedio, independientemente de la terapéutica. Lo más importante es que la negatividad de la prueba excluye hasta un 95% el diagnóstico de amibiasis invasiva, en pacientes inmunocompetentes y con cuadro clínico de por lo menos 5 días de iniciado.

Inhibición de hemaglutinación. Es una prueba cuantitativa a base de eritrocitos sensibilizados con antígenos amibianos monoxénicos. Es una de las reacciones más usadas en la práctica médica. Se ha encontrado positiva entre el 90 y 100% de absceso hepático amibiano con títulos iguales o mayores a 1: 128. En la amibiasis intestinal invasora, entre el 80-90% de los casos tuvieron títulos elevados. En portadores asintomáticos con quistes, el 50% mostraron títulos altos y en la colitis ulcerosa o enteritis regional fue positiva en el 1% en títulos de 1: 128 o más.

Contrainmunolectroforesis. Es una prueba cuantitativa. Tiene mayor o igual sensibilidad que otras pruebas serológicas. La ejecución es rápida y sencilla; se titulan anticuerpos. El principio se

basa en la afinidad de cargas eléctricas entre el antígeno de *E. histolytica* y anticuerpos correspondientes. En pacientes con amibiasis invasiva se pueden detectar títulos de 1: 128 o más, los títulos menores no son detectados.

ELISA. Es un método altamente sensible y específico. Es hasta ahora el más prometedor. Se basa en anticuerpos monoclonales; sin embargo es positiva tanto en enfermos como en portadores.

La Precipitación en gel y fijación de complemento. Son de utilidad en el diagnóstico de la amibiasis por que detectan anticuerpos que desaparecen a los 6 meses, lo que implica una correlación con el curso clínico de la enfermedad.

Inmunofluorescencia. Es una prueba cuantitativa, altamente específica y sensible, no se encuentra al alcance de todos los hospitales. En esta prueba, así como en las otras mencionadas anteriormente, el tiempo de ejecución podría retardar la obtención de resultados, por lo que sus indicaciones se concretan a casos problemas serios en el diagnóstico o en estudios epidemiológicos.

La Inmovilización de trofozoítos. Es una prueba que detecta anticuerpos, no es muy utilizada en la práctica diaria y no es común que se encuentre en laboratorio clínico de rutina, sólo en laboratorios de investigación, (7, 22, 23).

La amibiasis es la infección producida por un protozooario llamado *Entamoeba histolytica*, especie parásita del hombre, que puede vivir como comensal en el intestino grueso e invadir la mucosa intestinal produciendo alteraciones y tener localizaciones extraintestinales.

La amibiasis puede considerarse una parasitosis cosmopolita, ya que se encuentran casos en todo el mundo, con prevalencia muy variable. Predomina en países tropicales, los porcentajes varían de acuerdo a los grupos poblacionales estudiados, a la metodología utilizada y a la época del año en que fueron realizadas las investigaciones, (24).

A nivel mundial se estima que en 1984, 500 millones de personas fueron infectadas con *Entamoeba histolytica*, 38 millones desarrollaron colitis o abscesos extraintestinales y 40 mil muertes fueron atribuidas a amibiasis. A escala global ocupó el tercer lugar entre los parásitos causantes de muerte, (25).

De acuerdo a reportes de la OMS este parásito puede infectar hasta un 10% de la población mundial y causar de 40.000 a 110.000 muertes por año; esta es considerada la tercera parasitosis después de Schistosomiasis y malaria. En Venezuela es la infección parasitaria con un alto significado patológico, reportándose seroprevalencias de 4.4% , 29.2 % y 46.65 en algunas áreas pobres del estado de Zulia, (26).

La identificación de *E. histolytica* en heces es todavía un problema en el diagnóstico de rutina ya que debe ser diferenciada de un número de protozoos que habitan en el lumen intestinal como *E. coli*, *E. hartmani*, *Iodoameba butschilii*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia* y la más importante *E. dispar*, siendo esta última indistinguible de *E. histolytica* por características morfológicas, (27), sin embargo hay diferencias genéticas entre las dos especies que pueden ser detectadas usando Análisis inmunoenzimáticos, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Sondas de ADN específicas, o Anticuerpos monoclonales, (28, 29,30).

Estudios de Zimodemos de *E. histolytica* encontraron dos grupos de amebas, una patógena y una no patógena , ambas presentaron patron enzimático diferentes, (31).

En estudios de PCR utilizando primers específicos y anticuerpos monoclonales se han podido identificar diferencias entre cepas patógenas y no patógenas . Por esta razón algunos autores consideran dos especies de amebas: *Entamoeba histolytica* capaz de causar enfermedad y *Entamoeba dispar* considerada como un comensal intestinal, (32).

La amibiasis invasiva es el principal problema social y de salud en áreas de Africa , Asia y América Latina donde las inadecuadas condiciones higiénicas sanitarias y la presencia de cepas virulentas de *E. histolytica* permite mantener una alta incidencia de amebiasis intestinal y extraintestinal, (33).

La amebiasis se encuentra entre los principales problemas de salud en México, y se presenta de forma asintomática y sintomática. No se conocen todos los mecanismos que determinan su patogenicidad por lo que su estudio a nivel molecular permite hacer diferencias entre las dos cepas a nivel de DNA y conocer que moléculas podrían ser candidatos para indicar factores de patogenicidad y mejorar los métodos de diagnóstico diferencial entre estos parásitos, (34).

En 1970-1972 Vigil describieron epidemias de disentería bacilar, señalando el encuentro frecuente de *E. histolytica* en heces de pacientes. También reportaron que la amebiasis crónica es endémica en Nicaragua, (35).

De acuerdo al registro del Hospital de León, el 45% de las heces examinadas en el laboratorio durante el periodo 1981-1983, contenían *E. histolytica*. Años más tarde en este centro se encontraron casos de abscesos hepáticos presumiblemente causados por *E. histolytica*, (36).

En 1988 estudios realizados por Téllez et. al. analizaron 562 muestras de sueros tomados en diferentes grupos de edad en Instituciones educacionales, demostrando en los grupos de 6 a 15 años, una seropositividad para *E. histolytica* . del 48%., (37).

En el Barrio La Providencia de León(Meyer y Morales 1990) encontraron prevalencia de infección de *E. histolytica* del 20.6% y una seropositividad de 26.4 % utilizando el método de ELISA, (38).

En el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-LEON en un estudio piloto, se encontró una prevalencia de *E. histolytica* del 10% utilizando el examen microscópico de las heces.

Leiva B. et. al realizaron un estudio seroepidemiológico en el municipio de León, encontrando al Barrio de Zaragoza con la mayor prevalencia (30%) en el análisis fecal y una seropositividad del 52%. La prevalencia más baja (11%) fue encontrada en el Barrio El Laborío y el Barrio El Calvario presentó la seropositividad más baja de (14%), (39).

Téllez et.al. (1993) realizó un estudio de prevalencia de parásitos intestinales en una población de ciudad de León encontrando una prevalencia de infección de *E. histolytica* mediante microscopía de luz de 18.6%.(40)

Dado que las enfermedades parasitarias causadas por *Entamoeba histolytica*, causan problemas graves de salud en diferentes grupos de edad y debido a la existencia de dos cepas morfológicamente idénticas: *E. histolytica* y *E. dispar*, pero genéticamente diferentes, la microscopía es incapaz de establecer las diferencias genéticas de ambas cepas por lo que se necesita realizar técnicas específicas y moleculares que nos permita identificar ambas especies para conocer la verdadera realidad en nuestro medio.

OBJETIVO GENERAL

Identificar *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* empleando métodos enzimáticos y moleculares en pacientes con diarrea en tres centros de salud de León.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Identificar los principales parásitos encontrados mediante examen microscópico.
2. Describir las características clínicas de los pacientes con enfermedad diarreica.
3. Identificar *E. histolytica* / *E. dispar* mediante el método enzimático de “Triage.”
4. Diferenciar *E. histolytica* y *E. dispar* mediante técnicas moleculares (PCR).
5. Comparar la concordancia de los diferentes métodos utilizados en la identificación de *E. histolytica* / *E. dispar*.

MATERIAL Y METODO

TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio analítico de evaluación de pruebas diagnósticas que permitieron la identificación de *E. histolytica* / *E. dispar* mediante técnicas enzimáticas y moleculares.

AREA DE ESTUDIO

Tres áreas de Salud del municipio de León.

1. Centro de Salud Mántica Berio
2. Centro de Salud Sutiava
3. Perla Maria Norori

POBLACION DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó de Febrero a Agosto del 2002 en la ciudad de León en pacientes con diarrea mayores de 2 años. Se tomaron como criterios de inclusión todos los pacientes mayores de 2 años con diarrea y que no hallan ingerido antiparasitarios. Los objetivos de la investigación fueron cuidadosamente explicados a cada participante, todos los pacientes aceptaron participar en el estudio y se utilizó una ficha para la recolección de la información.

MUESTRA

Se recolectaron 134 muestras de pacientes mayores de 2 años que asistieron a los tres centros de salud antes mencionados, se les llenó una ficha que contenía los datos generales del paciente y datos de laboratorio, se les entregó un recipiente limpio para obtener la muestra, esta fue trasladada al Departamento de Microbiología y Parasitología para su procesamiento. A las muestras se les realizó los siguientes métodos de laboratorio: Examen microscópico, Triage y PCR.

PROCEDIMIENTOS

Examen microscópico

Principio del Método:

La microscopía simple es el método de examinación de las heces fecales en solución salina y lugol que permite detectar huevos, quistes y trofozoítos.

PROCEDIMIENTO

Se realizó diariamente examen microscópico de heces frescas utilizando una gota de solución salina y una gota de solución de yodo, se hizo la observación microscópica para la identificación las amebas.

METODO TRIAGE

Principio del Método:

El panel para parásitos Triage es un test inmunológico enzimático para detección de *G. lamblia*, *E. histolytica* / *E. dispar* y *C. parvum* en muestras fecales humanas frescas recién congeladas y sin fijar. Los antígenos específicos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *C. parvum* presentes en las muestras de heces se aíslan y se inmovilizan en una membrana mediante anticuerpos específicos. Los antígenos inmovilizados se incuban con conjugados de enzima – anticuerpo que se unen a sitios específicos de los antígenos. Tras añadir la solución de lavado y el sustrato, la presencia de los antígenos específicos se detecta visualmente por la presencia de una barra de color púrpura a negra junto al nombre impreso en la placa test.

Una muestra positiva produce una barra nítida de color púrpura a negra en la zona de test adyacente al nombre del antígeno. Una muestra negativa no produce ninguna barra de color. Las zonas de control positivo contienen los agentes inmovilizados de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *C. parvum* unidos a anticuerpos específicos. Si se realizan correctamente todos los pasos del test, se obtendrá una barra de color en las tres zonas de control positivo.

Parasite Panel Biosite Diagnostics San Diego, Ca. Es un método enzimático comercial, cualitativo basado en anticuerpos monoclonales específicos de G. Lamblia (3 ng de alfa- 1 giardina), E. histolytica / E dispar (4 ng del antígenos de superficie de 29 kDa) y Criptosporidium parvum (6 ng la proteína disulfuro isomerasa) unidos a una enzima (fosfatasa alcalina). El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando el procedimiento adjunto al test. Los resultados fueron comparados con los controles positivo y negativo.

MATERIALES

- Reactivo “ Triage”
- Placa test
- Diluyente de la muestra (solución tampón)
- Conjugado (anticuerpos monoclonales unido a Fosfatasa alcalina)
- Solució de lavado
- Sustrato (Indoxil fosfato en solución tampón)
- Control positivo
- Control negativo.

PROCEDIMIENTO

Se utilizaron heces frescas de pacientes con diarrea, se preparó la muestra con un diluyente suministrado en el test y se centrifugó a 1500 g.

Con una pipeta de tranferencia se añadió 500 ul de la muestra filtrada y centrifugada a la zona de la placa test “Triage” se dejó absorber la muestra completamente.

Se añadió el conjugado (anticuerpos monoclonales unidos a una enzima fosfatasa alcalina) directamente en el centro de la zona de detección de la placa test y se incubó durante 3 minutos.

Se añadió 6 gotas de solución de lavado (solución tamponada) en la zona de detección, se dejó absorber completamente y se repitió este paso nuevamente.

Se añadió 4 gotas de sustrato (Indoxil fosfato en solución tampón) y se incubó durante 5 minutos.

Después de la incubación fueron leídos los resultados y los controles positivo y negativo.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Principio del Método:

El principio fundamental del PCR se basa en la amplificación de fragmentos específicos de DNA mediante la multiplicación experimental de ciclos sucesivos hasta obtener suficiente producto para ser visualizado. De esta manera una molécula simple de DNA puede ser amplificada más 1000 millones de veces en 30 ciclos de reacción.

Termociclador: - Desnaturalización	90 ⁰ C x 20 seg.
- Amplificación	55 ⁰ C x 20 seg
- Extensión	72 ⁰ C x 60 seg

MATERIALES

- QIAamp spin columns
- Tubos de 2 ml.
- Buffer AL
- Buffer ATL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- QIAGEN Proteasa
- Proteína K
- Buffer sin MgCl₂
- DNTP mix
- MgCl₂ 25 mM

- Primer
- Template DNA
- DNA polimerasa termoestable

PROCEDIMIENTO

La extracción del ADN se hizo con un producto comercial (QIAamp QIAGEN Germany) a partir de las muestras de heces preservadas con etanol al 70% y que fueron almacenadas a 4-8°C mientras se realizaba la extracción. El procedimiento se llevó a cabo con algunas modificaciones del protocolo adjunto al test. Una vez extraído el DNA se prepararon las muestras haciendo mezcla de MgCl₂, dNTP mix, primer mix, DNA polimerasa termoestable y agua destilada, esta mezcla fue colocada en el termociclador (Termocycler 5330) durante 4 horas, la desnaturalización se llevó a cabo a 90°C, la amplificación a 55°C, y la extensión a 72°C. Se hizo la preparación del gel con Agarosa (SIGMA) utilizando bromuro de etidio y se procedió a la colocación de las muestras en el gel, se utilizaron primer específicos de *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente. Se realizó el corrido electroforético a 95 voltios durante 45 minutos y se colocó el gel en el transiluminador para observar las bandas de DNA, se dejó secar y se tomaron fotos.

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN	INDICADOR	VALOR
Características clínicas.			
Edad:	Edad de un individuo expresada como el período de tiempo que ha pasado desde el nacimiento.	-	Años
Sexo:	Clasificación de los hombres o mujeres teniendo en cuenta numerosos criterios (anatómicos y cromosómicos)	-	Masculino o Femenino
Dolor abdominal:	dolor agudo o crónico que puede ser localizado o difuso, y que se origina en la cavidad abdominal.	Referido por el paciente	Si o No
Tenesmo:	Deseo continuo, doloroso e ineficaz de orinar o defecar, producido por una irritación del cuello vesical o del ano.	Referido por el paciente	Si o No
Vómito:.	Material procedente del estómago que se expelle al exterior a través del esófago	Anamnesis	Si o No
Fiebre:	Elevación anormal de la temperatura del cuerpo por encima de 37 ° C debida a enfermedad.	Anamnesis	Si o No

Nausea:	Sensación previa al vómito	Anamnesis	Si o No
Distensión abdominal:	Lesión habitualmente muscular debido a un esfuerzo físico exagerado.	Anamnesis	Si o No
Examen general de heces. Microscópico			
Presencia de quistes y trofozoítos de protozoarios intestinales.	Se deberá observar estructuras compatibles con quistes, trofozoítos, huevos de parásitos intestinales.	Resultado de observación microscópica.	Si o No
Presencia de huevos y larvas de Helminths			
M. “Triage”			
Detección de antígenos de: <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>C. parvum</i> .	Test inmunoenzimático para la detección de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>C. parvum</i> en heces frescas.	Reacción colorimétrica	Positivo o Negativo
PCR			
Detección de bandas de ADN de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .	ADN de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .	Presencia de banda de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	Positivo o Negativo

PLAN DE ANÁLISIS

Se realizó un análisis descriptivo de los datos en el programa Epi Info versión 6.01. Se estimó la frecuencia simple de los datos determinándolos en porcentajes y se calculó el índice de Kappa a los métodos de diagnóstico empleados en el estudio.

Se analizó la relación entre el examen microscópico con los otros métodos empleados, se calculó el Índice de Kappa mediante el programa SPSS versión 8.

RESULTADOS

Se realizó examen microscópico de las heces fecales de 134 pacientes mayores de 2 años que asistieron a los 3 centros de salud de la ciudad de León. Se encontró una frecuencia de parásitos intestinales de *Giardia lamblia* 25 (16.4%), *Trichiuris trichiura* 9 (6.7%), *Entamoeba histolytica/ dispar* de 7 (5.2%), *Ascaris lumbricoides* 5 (3.7%), *Hymenolepis nana* 5 (3.7%), *Strongyloides stercoralis* 2 (1.5%).

Tabla 1. Frecuencia de parásitos intestinales en 134 muestras fecales de individuos con diarrea. León, Febrero- agosto 2002

Parásitos	Número	Porcentaje
<i>Giardia lamblia</i>	25	18.6
<i>Trichuris trichiura</i>	9	6.7
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	7	5.2
<i>Ascaris lumbricoides</i>	5	3.7
<i>Hymenolepis nana</i>	5	3.7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	1.5

Se analizaron las características clínicas de los pacientes con diarrea encontrando dolor abdominal en 118 (88.1%), náuseas 73 (54.5 %), distensión abdominal 67 (50%), tenesmo 53 (39.6%), fiebre 57 (42.5%), vómito 49 (36.6%). Al relacionar las características clínicas de la diarrea con la presencia de amebas no se encontraron asociación estadísticamente significativa.

Tabla 2. Características clínicas de 134 pacientes con diarrea. León, Febrero a Agosto 2002.

Síntoma / signo	Número	Porcentaje
Dolor abdominal	118	88.1
Náuseas	73	54.5
Distensión abdominal	67	50.0
Tenesmo	53	39.6
Vómitos	49	36.6

Se realizó el método enzimático Triage para detección de antígenos de *E. histolytica / dispar*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* encontrando una frecuencia de *Giardia lamblia* 22 (16.4%), *E. histolytica / Entamoeba dispar* 1 (0.7%) y *Cryptosporidium parvum* 0%. Se analizó la concordancia entre el Triage y la microscopía con respecto a *Giardia lamblia* presentando una excelente concordancia, índice Kappa= 0.923. Al relacionar el Triage con la microscopía con respecto a *E. histolytica / E. dispar* se encontró una baja concordancia, índice Kapa= 0.240.

Tabla 3. Detección de antígenos de Entamoeba histolytica/ dispar, Giardia lamblia y Cryptosporidium parvum mediante el test Triage Micro Parasite Panel en muestras de individuos con diarrea. León, Febrero- agosto 2002.

Especie	Positivo		Negativo	
	No.	%	No.	%
<i>Entamoeba histolytica / dispar</i>	1	0.7	133	99.0
<i>Giardia lamblia</i>	22	16.4	112	83.6
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0	0	0	0

En el PCR se encontró una frecuencia de infección por *E. histolytica/ E dispar* de 12 /134 (9.0%), *E. histolytica* 3 /12 (2.2%), *E. dispar* 9/ 12 (6.7%). Se analizó la distribución de *E. histolytica* y *E. dispar* según los grupos de edad encontrándose para *E. histolytica* de 2-4 años (0%), de 5-14 años 1 (3%) y mayores de 15 años 2 (4.5%). Para *E. dispar* de 2-4 años 2 (3.5%), de 5-14 años 2 (6.1%) y mayores de 15 años 5 (11.4%). Al relacionar el PCR con la microscopía, se encontró una baja concordancia, Kappa= 0.267.

Tabla 4. Detección de *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* por las técnicas de microscopía, Triage y PCR en 134 muestras diarreas. León, Febrero-Agosto 2002.

Especie	Microscopía	Triage	PCR
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	7 (5.2%)	1 (0.7%)	12 (9%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	Na	na	3 (2.2%)
<i>Entamoeba dispar</i>	Na	na	9 (6.7%)

Tabla 5. Distribución de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* por grupos de edad en 134 individuos con diarrea. León, Febrero-Agosto 2002

Grupo de Edad	Entamoeba histolytica No. (%)	Entamoeba dispar No. (%)	Entamoeba histolytica/dispar No. (%)
2 a 4	0 (0.0)	2 (3.5)	2 (3.5)
5 a 14	1 (3.0)	2 (6.1)	3 (9.1)
> de 15	2 (4.5)	5 (11.4)	7 (15.9)
Total	3 (2.2)	9 (6.7)	12 (9.0)

DISCUSIÓN

En este estudio realizado en 3 centros de salud de la ciudad de León, se realizaron 3 métodos de laboratorio: Examen microscópico, método enzimático (Triage Parasite Panel) y PCR. Mediante el examen microscópico de las heces se encontró prevalencia de parásitos intestinales de *E. histolytica / dispar* de 5.2%, *Giardia lamblia* 18.6%. Otros estudios han reportado prevalencias mayores de *E. histolytica / E. dispar* de 20.6%, 18.8%, 28.2%, 27%, 11.8%, indicando que la amebiasis es endémica en Nicaragua. (15, 40,41,42,43).

La prevalencia de *Giardia lamblia* encontrada es similar a la de otros estudios en los mismos grupos de edad, estos datos se asocian a las bajas condiciones socioeconómicas y sanitarias propias de países subdesarrollados. (40)

Al analizar las características clínicas de los pacientes con diarrea se encontró que el 88.1% de los pacientes presentaron dolor abdominal, y 54.5% náuseas. Al analizar las características clínicas de la diarrea con la presencia de amebas no se encontró asociación estadísticamente significativa con los signos y síntomas clínicos. Es probable que en este estudio no se encontró ninguna asociación debido a que fue muy poca la cantidad de *E. histolytica* encontrada.

En el método enzimático Triage, se encontró prevalencia de *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar* de del 0.7% y *Giardia lamblia* 16.4%, *Cryptosporidium parvum* 0% . Al relacionar el método Triage y el examen microscópico con respecto a *E. histolytica / E. dispar* se encontró una baja concordancia, Kappa= 0.240. Otros estudios han demostrado que este método detecta mayor número de parásitos (45,46,47). Se presume que la baja prevalencia de *E. histolytica / E. dispar* observada en el método Triage es atribuida a la baja carga parasitaria; estudios realizados a partir del cultivo de las amebas han demostrado que este método requiere de más de 1000 trofozoítos por ml para dar una reacción positiva en el test (45). También es probable que las cepas encontradas en el presente estudio posean una variación conformacional en la secuencia de aminoácidos en el antígeno de superficie de la ameba con respecto a las utilizadas en otros estudios y de esta manera pierde el carácter antigénico. Se analizó la concordancia en el método Triage y el examen microscópico con respecto a *Giardia lamblia*,

encontrando una excelente concordancia Kappa=0.923. Estos datos son similares a los reportado por otros estudios.(45, 46,47).

La prevalencia encontrada de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante el PCR fue 12 / 134 (9%), *E. histolytica* 3 / 12 (2.2 %), *E. dispar* 9 / 12 (6.7%). Otros estudios han reportado prevalencias mayores en cuanto *E. histolytica*,17.6%, 21.4% respectivamente. (48, 49) y similares en relación a *E. dispar* 7.9%, 9.9% (49). La baja prevalencia de *E. histolytica* puede ser atribuida a los criterios de inclusión del estudio, o puede ser que anteriormente se incurrió en un sobre diagnóstico, donde *E. histolytica* / *E. dispar* la confundieron con otras especies de ameba. La mayor proporción de *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* por grupos de edad fue encontrada en mayores de 15 años. Otros estudios han reportando prevalencias de *E. histolytica*/ *E. dispar* en los grupos de 10-19 y 15-19 años respectivamente.(40, 15).

En relación al PCR y la microcopía no hubo concordancia, índice de Kappa = 0.267, una vez más se demuestra las limitaciones que tiene la microscopía en la de detección de *E. histolytica* / *dispar*.

El examen microscópico detectó 7 /134 5.2%, el método Triage 1/ 134 0.7% y el PCR 12 / 134 9% de un total de 134 muestra analizadas. Se puede observar claramente que el PCR demostró una clara ventaja sobre los otros métodos en la detección e identificación de amebas. Estudios han demostrado la diferenciación molecular de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante este método recomendándolo como una alternativa en la detección y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar*. (50,51).

CONCLUSIONES

1. En el examen microscópico de las heces solamente detectó 7/134 (5.2%) de *E. histolytica/ E. dispar*
2. No se encontró ninguna relación de los pacientes con amebas y las características clínicas.
3. El método enzimático Triage detectó 1/134 (0.7%) de *E. histolytica/ E. dispar*.
4. El PCR detectó *E. histolytica/ E. dispar* 12/134 (9%), *E. histolytica* 3/12 (2.2%), *E. dispar* 9/12 (6.7%).
5. La concordancia entre el examen microscópico y el Triage con respecto a *Giardia lamblia*, hubo un índice de Kappa=0.923, en relación a *E. histolytica /E. dispar* fue 0.240. En relación al PCR y la microscopía no hubo concordancia, índice de Kappa=0.267.

RECOMENDACIONES

1. Mejorar el entrenamiento de técnicos de laboratorio para el adecuado diagnóstico del examen microscópico.
2. No se recomienda el Método enzimático Triage para el diagnóstico de la amebiasis.
3. Se recomienda el PCR para la detección e identificación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

BIBLIOGRAFIA

1. Levine N.D. Corliss J.O; Cox F.E; et. al. *A new revised clasification of the Protozoa*. J. Protozool 1980; 27: 37-8.
2. Romero Cabello, Herrera Benavente. *Síndrome diarreico infeccioso*. Editorial Médica Panamericana. Edición 2002.
3. Blanc D; R. Nicholls and P.G. Sargeaunt. *Experimental production of new zymodemes of Entamoeba histolytica supports the hipotesis of genetic exchange*. Trans. R Soc Trop Med Hig 1989; 83: 787-790.
4. Brancha R; L. S. Diamond, J. P. Akers, J. D. Burchard and D. Mirelman, *Diferenciación of Clinical isolate of Entamoeba histolytica by using specific DNA probes*. J Clin Microbiol 1990; 28: 680-684.
5. Sargeaunt P.G; and J. E. Williams. *Electrophoretic isoenzyme paterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli*. Trans R. Soc. Trop Med Hyg 1978; 72: 164 –166.
6. Bray R. S. And W. G. Harris. *The epidemiology of infection with Entamoeba histolytica in The Gambia . west Africa* Trans R. Soc. Trop Med Hyg. 1977; 71: 401 –407
7. Healy G. R. *Immunology tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiolgy in the United State*. Rev. Infect Dis 1986; 8: 239- 246.
8. Sargeaunt P. G; J. E. Williams, J. Kumate and E. Jimenez. *The epidemiolgy of Entamoeba histolytica in Mexico City. A pilot survey I*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74: 653 – 656.

9. Tachibana H; S. Kobayashi, Y. Kato K. Nagakura y. Kaneda and T. Takeuchi. *dentification of a pathogenic isolate- specific 30.000-M, antigen of entamoeba histolytica by using a monoclonal antibody*. Infect immun 1990; 58: 955 – 960.
10. Mirelman D. *Effect Entamoeba of culture condition and bacterial associate on the zimodemes of Entamoeba histolytica*. Parasitol Today 1987 ; 3: 37 – 40.
11. Brandt H. and R. Pérez – Tamayo. *Pathology of human amebiasis*. Hum. Pathol 1990; 1: 351 – 385.
12. Farri T. A. P.G. Sargeant, O. C. Warhurst, J. E. Williams and R. Bhojnani. *Electrophoretic studies of the hexokinase of Entamoeba histolytica groups I to IV*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:672-673.
13. Denis M. and K. Chadee. *Inmunopathology of Entamoeba histolytica infections*. Parasitol Today 1988; 4: 247- 252. I to IV. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74: 672 – 673.
14. Kretschmer R. R. *Inmunology of amibiiasis*, p. 95 – 167. In A. Martínez- Palomo (ed.) *Amebiasis: human parasitic diseases*. Elsevier science Publishing Co; New york 1986.
15. Orozco E. *Patogénesis in amebiasis*. Infect Agents Dis 1992; 1: 19 –21.
16. Joyce M. P. And J. I. Ravdin. *Pathology of human amebiasis*, P. 129 – 146 In J. I. Ravdin (ed) E. *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica* , John Wiley & Sons, Inc; New York 1988.
17. Jiménez F. *Pathology of amibiiasis*. Bull NY Acad Med 1981; 57: 217- 223.
18. Pérez- Montfort R. And R. P. Krestschmer. Humoral inmune reponses, p. 91- 103. In R. P. Kretschmer (ed) . *Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica*. CRC Pres.Boca Raton, Fla 1990.

19. Mirelman D. *Ameba- bacterial relationship in amebiasis*, p. 351- 369. In J. I. Ravdin (ed) *amibiasis: human infection by entamoeba histolytica*. John wiley & Sons, Inc. New york 1988.
20. Nanda R; U. Baveja and B. S. Anand. *Entamoeba histolytica* cyst passers: *Clinical features and outcome in untreated subjects*. Lancet 1984; ii: 301- 303.
21. Pittman F. E; W. K. El- Hashimi and J.C. Pitma . *Studies of human amebiasis. II. Light and electrón microcope observation of colonic mucosa and exudates in acute amebic colitis*. Gastroenteroly 1973; 65: 588- 603.
22. García L.S. and D. A. Bruckner . *Diagnostic medical parasitology*. Elsevier Science Publishing Col. Inc; New York 1988.
23. Healy G. R. and S. C. Kraft. *The indirect hemagglutination test for amebiosis in patients with inflammatory bowel disease*. Am J Dig Dis 1982; 17: 97-104.
24. Botero y Restrepo M. *Parasitosis humanas*. Ediciones Corporación para investigaciones biológicas. Medellin 1984, pp 21-38.
25. Wals J.A. *Amibiasis en el mundo* . Arch Invest Méd (Méx.)1986; 17 (supl. 1): 385
26. Urdaneta H, Rondon M. Muñoz M, Hernández M. *Isolation and Axenization of two Entamoeba histolytica strains*. Gen 1995; 49:23
27. Diamond L.S. Clark C.G 1993. *A redescription of Entamoeba histolytica* Shaudin 1903 (Emended Walker. 1911) *separating it from Entamoeba dispar* Brumpt 1925. J. Eucariot Microbiol. 40: 340-344.

28. Tannich E. Burchard GD. 1991. *Differentiation of pathogenic from non pathogenic entamoeba histolytica by restriction fragment analysis of single gene amplified in vitro*. J. Clin microbiol 29: 250-255.
29. Katzwinkel Wladdarssh S. Loscher T, Rinder H. 1994. *Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. DNA from stools specimens*. Am J. Trop. Med. Hyg 51: 115-118.
30. Christopher D. et. al. (1999) *Molecular- based diagnosis of Entamoeba histolytica infection..* Expert Teviews in Molecular Medicine: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
31. Clark C.G.and L. S. Diamond (1992) *Diferenttiation of pathogenic Entamoeba hitolytica from other intestinal protozoa by riboprinting* "Archives of Medical research." 1992. 23 82) 15-16
32. Sargeaunt PG. A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahé , The Seychelles archives of Medical Research 1992.; 23 (2): 265-267.
33. Martínez Palomo. A. (1987). " *The pathogenesis of Amoebiasis*" Parasitology today 3 (04) : 111-118.
34. Wals J.A. *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality*. Rev. Infec Dis 1986, 8: 228-38.
35. Vigil, C. (1970) " *An epidemic of dysentery in Nicaragua* " Lancet. 29 (2) : 471.
36. MINSAs 1991 *Plan trienal de Salud Ministerio de Salud*. Republica de Nicaragua.

37. Téllez, A. (1988) *Entamoeba histolytica en Nicaragua*.
Immunological and Metodological aspects. (Master Degree)
The Karolinska International Research Training program KIRT.
38. Meyer, E. and morales (1990) *Seroepidemiología de la Amoebiasis en La Providencia León*. (Licenciatura en Biología)
Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua- León.
39. Leiva B. (1992) *Seroepidemiological Study of Amoebiasis in León, Nicaragua*
(Master Degree) The Karolinska International
Research Training Program KIRT.
40. Téllez et.al 1993 *Prevalence of Intestinal Parasites in León, Nicaragua*
(MasteDegree) Department of Parasitology Swedish Institute for Infectious Disease
Control Stockholm, Sweden.
41. Mercado et al *Frecuency of Infection, Nutritional Condition and Digestive Manifestations in Children from Boarding Houses and a Day Care Center*. Santiago, Chile. Bol. Chil. Parasitol; 1988 43: 41-46.
42. Simonetta G. Et al *Amebis Infections due to The Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar complex: A Study of Incidence in a Remote Rural Area of Ecuador*. Am J. Trop. Med. Hyg; 67 (1), 2002 pp. 123- 127.
43. Beth L. et al *Use of a Monoclonal Antibody in an Enzime Immunoassay for The detection of Entamoeba histolytica in Fecal Specimens*. Am. J. Trop. Med. Hyg 34 (3), 1985 pp. 465-472.
44. Téllez et al *Amebiasis en Nicaragua: Class Specific Serum Antibody Responses*.
University Hospital "Oscar Danilo Rosales" León Nicaragua Dept. of Infectious
Diseases, Huddinge Swiden National Bacteriological Laboratory Stockholm,
Sweden and Pharmacia Diagnostic, Uppsala, Sweden. Vol 23, No 2 261-264, 1992.

45. Lynne S. Et al *Detection of Giardia lamblia, Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar, and Criptosporidium parvum Antigens in Human Fecal Specimens*. Using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay. Journal of clinical Microbiology, Sep. 2000, p. 3337-3340.
46. Dylan R. Et al *Immunocromatographic Strip- Based Detection of Entamoeba histolytica- E. dispar and Giardia lamblia Coproantigen* Journal of Clinical Microbioly, Sept. 1999, , p 3017-3019.
47. Susan E. et al *Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of Giardia lamblia, Entamoeba histolytica / entamoeba dispar, and Crytosporidium parvum in Patient Stool Specimens*. Journal of Clinical Microbiology, Jan 2001, p. 332-334.
48. J:J. Verweij, J. Blotkamp, et al *Diferentiation of entamoeba histolytica and Entamoeba dispar Cysts Using Polimeras Chain Reaction on DNA Isolated from Faeces with Spin columns*. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis (2000) 19: 358-361.
49. Angelos Evangelopoulos et al *Microscopy, PCR and Elisa applied to the of epidemiolgy Amoebiasis in Greece*. National Shool of Public Health, Department of Prasitology Entomology and Tropical Diseases, 196 Alexandras Avenue, 11521 Athens, Greece. Parasitology International 50 (2001) 185-189.
50. Aguirre A. Characterization of Two Venezuelan enatamoeba histolytica Strains Using Electrophoretic Isoenzyme Patterns and PCR-CHELA. Centro de investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical-CIMPAT. Universidad de los Andes, Santa Fe de Bogotá Colombia. Volumen 28, Supl., pp.S287, 1997.
51. Evangelopoulos,G. Et. al *A nested, multiples, PCR assay for the simultaneous detection and differentition of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in faeces*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 94, No. 3 233-240. (2000).