

## SEROPREVALENCIA DE *Entamoeba histolytica* Y DIAGNÓSTICO DE AMIBIASIS EN CUMANÁ, ESTADO SUCRE, VENEZUELA

### SEROPREVALENCE OF *Entamoeba histolytica* AND AMOEBIASIS DIAGNOSIS IN CUMANÁ, SUCRE STATE, VENEZUELA

BETHSY DEL C. CEDEÑO A.<sup>1</sup>, ANA C. GARCÍA<sup>2</sup>, NACARID ALFONZO<sup>3</sup>, HAYDÉE URDANETA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

<sup>2</sup>Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.

<sup>3</sup>Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de los Andes. e-mail: bethsyc3@yahoo.es

#### RESUMEN

Estudio transversal, descriptivo durante el lapso noviembre 2003 a noviembre 2004, donde se investigó la seroprevalencia de infección de *Entamoeba histolytica* y su relación con factores epidemiológicos como: edad y sexo en 480 individuos con edades comprendidas entre 0-14 años que asistieron a los ambulatorios: “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre. El complejo *E. histolytica/E. dispar* se evidenció a través de examen coproparasitológico el cual incluyó: examen directo con solución salina fisiológica al 0,85%, coloraciones con lugol y tricrómica, técnica de Ritchie y prueba de sangra oculta. Se realizó análisis serológico para la detección de anticuerpos IgG anti *E. histolytica* por la técnica de ELISA. La seroprevalencia de *E. histolytica* fue 57,29 % (n= 275) en la población estudiada. En contraste, empleando técnicas convencionales la prevalencia fue 11,45 % por método directo y 10,00 % empleando coloración tricrómica. El diagnóstico de amibiasis intestinal en el grupo sintomático fue 11,7 % (n= 56). El sexo no fue determinante en la amibiasis, mientras que, la edad se encontró asociada a la enfermedad. Los niños menores de ocho años fueron los más afectados por la amibiasis. Estos resultados demuestran que la población es endémica para la amibiasis y deben existir factores de riesgo que contribuyen a la transmisión del parásito, de manera que el gobierno regional debería implementar medidas para controlar esta enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** Seroprevalencia, *Entamoeba histolytica*, amibiasis, ELISA.

#### ABSTRACT

A descriptive, cross-sectional study was undertaken during the period of November 2003 - November 2004 to investigate the seroprevalence of infection with *Entamoeba histolytica* and its relationship with age and sex in 480 randomly selected individuals under 14 years of age who assisted to Dr. Arquímedez Fuentes Serrano and Salvador Allende out-patience hospitals in Cumaná, Sucre state. The *E. histolytica/E. dispar* complex was evidenced by conventional stool tests comprising by direct observation with 0.85% sodium chloride solution, lugol and trichromic staining, the Ritchie technique, and fecal occult blood tests. A serological analysis to detect IgG antibodies against *E. histolytica* was performed using the ELISA technique. *E. histolytica* seroprevalence was 57.3% (n = 275) in the population studied. By contrast, prevalence was 11.5% by the direct method and 10.0% by trichromic staining. Intestinal amoebiasis was diagnosed in 11.7% of the symptomatic group (n= 56). Sex was not associated to amoebiasis, while age was associated to the disease. Children under 8 year of age were the most affected by amoebiasis. These results show that this is an endemic population for *E. histolytica* and risk factors must be present to contribute in the transmission cycle. Regional Government officials should implement measures to control the disease.

**KEY WORDS:** Seroprevalence, *Entamoeba histolytica*, amoebiasis, ELISA.

#### INTRODUCCIÓN

La amibiasis intestinal es una infección del intestino grueso producida por el protozooario *Entamoeba histolytica*, el cual puede invadir la mucosa intestinal, producir ulceraciones y por vía hematogena localizarse en sitios extraintestinales siendo el hígado el más

frecuentemente afectado con producción de abscesos, también puede alcanzar otros órganos (cerebro, pulmón y piel) ocasionando varios tipos de patologías. El establecimiento y persistencia de ésta infección no depende exclusivamente de los mecanismos de daño tisular empleados por el parásito, sino que es una conjunción multifactorial donde la modulación de la

respuesta inmunológica (RI) del hospedero juega un papel central en el desarrollo de las diferentes formas clínicas de la enfermedad (Espinosa y Martínez 2000; Castaño *et al.*, 2001).

La capacidad que tiene *E. histolytica* de producir enfermedad en humanos se ha relacionado con la resistencia de ésta a los mecanismos de defensa del hospedador ya sea por el recambio de proteínas de superficie, movilización de inmunocomplejos y presencia de cisteína proteasas que degradan inmunoglobulinas y anafilotoxinas. También se ha demostrado que la invasión tisular por *E. histolytica* induce supresión de la respuesta inmune celular y a pesar de la infiltración de células inflamatorias la amiba prolifera en el absceso hepático (Espinosa y Martínez 2000; Viasus *et al.*, 2004).

Debido a la notoria discrepancia entre el número de individuos infectados por *E. histolytica* y la baja frecuencia de la enfermedad, Brumpt (1925) sugirió la existencia de dos especies una patógena a la que denominó *Entamoeba disenteriae* y una no patógena a la que denominó *Entamoeba dispar*, sin embargo, esta propuesta no fue aceptada y *E. dispar* paso al anonimato como sinónimo de *E. histolytica* por más de medio siglo (Chacín 2001). Para 1993, Diamond y Clark basándose en las pruebas acumuladas (funcionales, bioquímicas, inmunológicas y genéticas) realizan la redescipción formal señalando la existencia de dos especies morfológicamente idénticas: *E. histolytica* patógena y *E. dispar* no patógena.

*Entamoeba dispar* no causa enfermedad invasora, ni induce la producción de anticuerpos específicos (Huston *et al.*, 1999; Gómez 1997). En contraste, las infecciones por *E. histolytica* producen respuesta inmune humoral y celular, además se activan las rutas clásicas y alternativas del sistema de complemento (Espinosa y Martínez 2000; Dimiceli 2004). Los anticuerpos contra el parásito causal de amibiasis se han detectado tanto en suero como en material fecal, durante el proceso infeccioso se ha encontrado aumentada la IgG; sin embargo, la IgA e IgM séricas pueden encontrarse pero en menor grado (Pérez y Krestschmer 1994). Debido a que los anticuerpos permanecen detectables por períodos de tiempo variables pueden ser empleados para la realización de estudios seroepidemiológicos, que en combinación con la clínica y aspectos epidemiológicos permiten identificar una infección causada por *E. histolytica* (Fonte 2000; Reyes y León 2002).

La confirmación de la existencia de *E. dispar* como amiba no patógena cambió drásticamente las cifras sobre la epidemiología de la amibiasis. Actualmente se estima

que 50 millones de personas se infectan anualmente encontrándose mayor morbilidad y mortalidad infantil en Centro y Sur América, África Occidental, subcontinente Indio y Lejano Oriente, colocándose en segundo lugar dentro de las parasitosis que causan más muertes después de la malaria. Aproximadamente 10 % (5 millones) de los individuos infectados desarrollarían síntomas clínicos; colitis amibiana (98%), mientras que, del 2% a 20% podrían presentar amibiasis extraintestinal siendo el más frecuente el absceso hepático (Kreidl *et al.*, 1999; Espinosa y Martínez 2000; Chacín 2001; Castaño *et al.*, 2001).

La amibiasis se ha relacionado con ciertos factores como: edad, hábitos culturales y condición socioeconómica siendo más prevalente en grupos que viven hacinados donde las condiciones higiénicas y sanitarias favorecen la transmisión del parásito (Chacín *et al.*, 1998; Espinosa y Martínez 2000; Fonte 2000).

Durante décadas el examen microscópico ha sido el método empleado para la identificación de *E. histolytica*, ya que la demostración de trofozoítos hematófagos en las heces es una condición altamente asociada con amibiasis aguda e invasora, pero en ausencia de éstos, la sensibilidad de este examen es limitada, ya que no permite diferenciar los quistes de *E. histolytica* de *E. dispar*. También es muy común la confusión de *E. histolytica* con otras amibas presentes en las heces como *E. coli* y células del hospedero como leucocitos, lo que ha ocasionado el sobrediagnóstico de la enfermedad (Fonte 2000).

Para 1997 se realizó una reunión con expertos en amibiasis donde participaron representantes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) donde se señaló la urgencia de emplear métodos que permitan mejorar la calidad del diagnóstico. Este debe incluir demostración de quistes y/o trofozoítos en las heces, presencia de cuadro clínico y anticuerpos séricos en títulos elevados (OMS/OPS/UNESCO 1997).

En la actualidad se han desarrollado técnicas de laboratorio más específicas y sensibles que permiten la diferenciación de estas dos especies: técnicas de cultivo seguida de análisis isoenzimático, PCR e inmunoensayos (ELISA) altamente sensibles que pueden detectar tanto antígenos en las heces como anticuerpos en el suero (Reyes y León 2002).

Para la detección sérica de anticuerpos anti-amibianos se han utilizado la casi totalidad de los procedimientos

serológicos conocidos donde los más empleados han sido la doble inmunodifusión, la contrainmuno electroforesis, la hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta (Luaces *et al.*, 1992; Urdaneta *et al.*, 1996) Sin embargo, el ELISA supera en sensibilidad y especificidad a todos los procedimientos precedentes. La técnica fue descrita por Engvall y Perlmann (1971), detecta diferentes tipos de anticuerpos, su sensibilidad y especificidad están cerca del 95 % -100 %. Bos y Steerenberg en la década de 1970 reportaron el primer ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos amebianos, a partir de entonces se han desarrollado numerosas variantes (Fonte 2000).

En Venezuela, la prevalencia de infección por *E. histolytica/E. dispar* varía de una región a otra y oscila entre 6,8 % a 42 %, afectando principalmente a los niños en edad escolar. Entre las entidades más afectadas se encuentran: Zulia, Falcón, Táchira, Lara, Aragua y Sucre. En esta última entidad, se ha señalado una prevalencia de 16 % para *E. histolytica/E. dispar* en pacientes con síntomas gastrointestinales de diarrea (Devera 1998; Rivero *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2005).

El Ministerio de salud notificó 122.389 casos de amebiasis en el país durante el año 1999. Para el año 2004 se registraron 100.948 casos de amebiasis, lo que indica que la enfermedad no ha sido controlada y aumenta su espectro (Chacón *et al.*, 2004).

Aunque los índices de morbilidad y mortalidad por enfermedades diarreicas en el estado Sucre son elevados, son escasos los estudios seroepidemiológicos sobre amebiasis y las cifras de prevalencia corresponden en su mayoría a examen coproparasitológicos, por lo que se desconoce la realidad de su epidemiología. Por otra parte, es fundamental la identificación de *E. histolytica* para evitar la aplicación de tratamientos innecesarios en la población. La presente investigación tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia de infección de *Entamoeba histolytica* y su relación con factores epidemiológicos como edad y sexo en individuos con edades comprendidas entre 0-14 años, en dos ambulatorios de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población

El presente es un estudio transversal, descriptivo donde se seleccionaron 480 individuos de ambos sexos con edades comprendidas entre 0 - 14 años que acudieron a los ambulatorios tipo I: “Dr. Arquímedes

Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de la ciudad de Cumaná, durante el periodo noviembre 2003 a noviembre 2004 a quienes el médico tratante les solicitó exámenes coproparasitológicos y de química sanguínea, los cuales no habían recibido tratamiento anti-parasitario un mes antes de la colecta de la muestra. El estudio se realizó siguiendo las normas de ética establecidas por la OMS para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki, ratificada por la 29ª Asamblea Mundial en Tokio (CIOMS 1993).

### ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO

Las muestras de heces fueron recolectadas por los individuos seleccionados en envases plásticos y se analizaron en un lapso no mayor de una hora. Se realizó examen macroscópico para obtener las características físicas de las muestras y microscópico para evidenciar el complejo *E. histolytica/E. dispar* mediante examen directo con solución salina fisiológica (SSF) al 0,85%, coloraciones con lugol y tricrómica. La técnica de Ritchie se aplicó sólo en las muestras que resultaron negativas al examen directo. Cuando la presencia de sangre no se observó macroscópicamente ni por examen microscópico, esta se determinó empleando la reacción de la bencidina (Botero y Restrepo 1998).

### Obtención de la muestra de sangre

En cada individuo se extrajo 5 ml de sangre por punción venosa con jeringas desechables de la vena ubicada en la cara anterior del antebrazo, previa asepsia del lugar, ésta se colocó en tubos de ensayo estériles sin anticoagulante. Posteriormente, la muestra fue centrifugada (centrifuga Damon/IEC división, modelo: HN3) por 10 minutos a 3.000 g para obtener el suero, éste se almacenó en tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad, previamente rotulados y se conservaron congelados a -20 °C hasta su posterior análisis (Henry 1985).

### Preparación del antígeno

El antígeno se preparó a partir de trofozoítos de *E. histolytica* de alta virulencia de las cepas: IULA:1092:1 aislada y axenizada por Urdaneta *et al.* (1995). El procedimiento fue el siguiente: se preparó previamente el medio TYI-S-33, se repicaron las amebas en tubos de ensayo en una campana de flujo laminar y luego fueron incubadas a 37 °C. Después de 72 horas de incubación los tubos de ensayo se colocaron en baño de hielo por 10 minutos para desprender las amebas del vidrio, luego el contenido de estos fue colocado en tubos de 50 ml y

centrifugados con buffer fosfato salino (PBS frío pH 7,2) a 2.000 g por 10 minutos. El sedimento obtenido se lavó tres veces con PBS (pH 7,2). Posteriormente, el sedimento fue resuspendido en 2mL PBS frío y tratado con 2 m mol/L de los siguientes inhibidores de proteasas: p-hidroximercuribenzoato (pHMB), fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) y N-L-P-tosil-l-fenilalanina clorometilcetona (TPCK). Luego se fraccionó por ultrasonido empleando un sonicador (Fisher Sonic Dismembrator, modelo N° 150) a una frecuencia de 40 Hertz por tres ciclos de 1 minuto alternando con 1 minuto de descanso, en baño de hielo. El homogeneizado obtenido fue centrifugado nuevamente a 2.000 g durante 30 minutos, se descartó el sedimento y el sobrenadante fue separado en alícuotas en tubos Eppendorf y almacenados a -20 °C constituyendo el extracto amibiano (Urdaneta *et al.*, 1998). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.*, (1951) ajustándose a 1mg/mL.

### Técnica de ELISA

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por Urdaneta *et al.* (1998). El procedimiento fue el siguiente: se colocaron 100µL del antígeno (2 µg/pozo) diluido en buffer carbonato-bicarbonato de sodio 0,1 mol/L (pH 9,6) en cada uno de los pozos de la placa (Costar), éstas se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas con buffer fosfato salino (pH 7,2) y Tween 20 al 0,05 % (PBS-T), se bloquearon los sitios libres de la placa con 100µl de PBS-T-caseína al 2 % (PBS-T-C), se incubó a 37 °C por una hora. Después se lavaron 5 veces con PBS-T. Luego en cada pozo se colocaron 100µL de las muestras y controles (por duplicado) diluidos en PBS-T-C (1:64, 1:256, 1:1024, 1: 4096), se incubaron durante una hora a 37 °C, seguidamente se lavó 5 veces con PBS-T y se colocaron 100µL IgG humana (SIGMA) diluida 1:1000 en PBS-T-C en cada pozo. Seguidamente se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 5 veces con PBS-T. El revelado se realizó por la adición de 100µL de ortofenilendiamina (OPD) al 0,002 % en buffer fosfato citrato 0,1 mol/L a pH 5,0 más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % V/V, luego se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos en oscuridad y para detener la reacción se agregó 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N en cada pozo. La lectura de la intensidad del color de la reacción desarrollada en cada pozo se realizó con un lector de ELISA (Reader 510 microwell systems), a una longitud de onda 492 nm y se expresó en densidad óptica (DO). Luego se determinó un punto de corte para cada placa analizada (valor calculado del promedio de las absorbancias de los sueros de referencia, controles negativos), más tres desviaciones estándar. Los resultados se calcularon mediante la comparación

de las DO obtenidas en los sueros con el punto de corte establecido. Los valores positivos: valores:  $\geq$  al valor del punto de corte y los valores negativos: valores  $<$  al valor del punto de corte.

### ESTUDIO CLÍNICO

Para realizar el estudio clínico, la población se clasificó en individuos sintomáticos y asintomáticos. El diagnóstico de amibiasis se realizó tomando en consideración las recomendaciones de la OMS/OPS/UNESCO (1997). En este sentido, se consideraron enfermos sólo aquellos individuos en los se observó presencia de quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica* en las heces, manifestaciones clínicas y títulos altos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica* (a partir de la dilución 1: 1024). Se aplicó una encuesta para recopilar datos personales y clínicos (diarrea, dolor abdominal, flatulencia, vómito y fiebre). Se excluyeron del estudio aquellos individuos mayores de 14 años, inmunosuprimidos, con patologías congénitas o en estado de shock.

Los datos se analizaron empleando Ji cuadrado ( $\chi^2$ ) a un nivel de significación del 95 % (Sokal y Rohlf 1969).

### RESULTADOS

En la población estudiada se encontró una prevalencia del 11,45% (55/480) para el complejo *E. histolytica* /*E. dispar*, mediante el método directo con SSF al 0,85 % y lugol, en tanto que, la prevalencia obtenida por coloración tricrómica fue menor (10,00%). Se evidenciaron trofozoítos hematófagos de *E. histolytica* en el 0,83% (4/480) de la población estudiada. (Tabla 1).

En la población, objeto de estudio, resultaron seropositivos 275/480 escolares, detectándose anticuerpos IgG anti *E. histolytica*, en títulos bajos, medios y altos, por lo que la seroprevalencia estimada fue 57,29%, mientras que en 42,71% (205/480) de la población no se detectó anticuerpos IgG anti *E. histolytica* como se ilustra en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se muestra la frecuencia de las manifestaciones clínicas encontradas en los individuos sintomáticos. En éste grupo, sólo 56 individuos presentaron moco y/o sangre en las heces, encontrándose con mayor frecuencia la presencia de dolor abdominal, seguido de flatulencia. Otros síntomas fueron vómitos y fiebre.

Tabla 1. Detección de *E. histolytica* y complejo *E. histolytica/E. dispar* por examen directo y coloración tricrómica en individuos provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre.

Métodos	Parasitado por			
	<i>E. histolytica/E. dispar</i>		<i>E. histolytica</i>	
	N°	%	N°	%
SSF y lugol	55	11,45	4	0,83
Coloración tricrómica	48	10,00	4	0,83

Tabla 2. Distribución de la frecuencia y clasificación de los títulos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica* detectados por ELISA en individuos provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre.

Clasificación	Título	$\bar{X}$	Densidad óptica rango	Ds	N° Sueros	%
Negativos	1/16-1/1024	0,179	0,001-0,332	0,258	205	42,71
Positivos						
Bajos	1/16-1/64	1,212	0,370-2,326	0,726	118	24,58
Intermedios	1/128-1/512	0,823	0,350-2,013	2,14	93	19,37
Altos	>1/1024	0,610	0,330-0960	0,24	64	13,33
Total					480	100,00

$\bar{X}$  : Punto de corte = 0,360.

En la población evaluada se evidenció que de los 480 individuos estudiados un total de 360 presentaron síntomas clínicos y 120 fueron asintomáticos. En la Tabla 4 se observa que 244 de los individuos sintomáticos presentaron títulos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica* y de estos 64 individuos presentaron títulos altos, mientras que, en el grupo de los asintomáticos no se detectaron títulos altos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica*.

En la Tabla 5 se presentan los resultados del diagnóstico de amibiasis, se puede apreciar que 56 de los escolares sintomáticos resultaron positivos por microscopía óptica, en cuatro de ellos se evidenció la presencia de trofozoítos hematófagos de *E. histolytica*, mientras que, en 52 de estos individuos se observaron quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* empleando técnicas convencionales. También se puede notar que en todos los casos se evidenció la presencia de dolor abdominal. Empleando la técnica de ELISA se confirmó que los 56 individuos con sospecha clínica de amibiasis presentaban títulos altos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica*. Con base en estos resultados, se determinó una seroprevalencia de 11,7 % para la enfermedad. En contraste, en el grupo asintomático 3 individuos presentaron quistes

de *E. histolytica/E. dispar* resultando negativos a anticuerpos mediante la técnica de ELISA.

En la Tabla 6 se ilustra la frecuencia de los individuos diagnosticados con amibiasis confirmados por ELISA distribuidos por sexo, notándose que de los 480 individuos estudiados 258 de ellos pertenecían al sexo femenino (53,75%) y 222 de éstos correspondían al sexo masculino (46,25%). Para el sexo femenino se encontró una seropositividad de 11,63%, mientras que, 11,71% de los individuos diagnosticados con amibiasis correspondían al sexo masculino. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la amibiasis y el sexo ( $\chi^2=0,0008$ ;  $p>0,05$ ).

En relación a la edad, se observó que el mayor número de individuos con amibiasis se localizó en los grupos etarios de 6 a 8 años y en niños menores de 6 años donde se ubicaron porcentajes de seropositividad para la enfermedad de 20,56% (22/107) y 13,23% (18/136), respectivamente, seguido del grupo de 9 a 11 años con 10,20% (10/98), luego disminuyó a 4,32% (6/139) en niños mayores de 11 años (Tabla 7). Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la amibiasis y la edad ( $\chi^2=16,03$ ;  $p<0,05$ ).

Tabla 3. Frecuencia de manifestaciones clínicas asociadas a la amibiasis en individuos sintomáticos provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre, entre noviembre de 2003 y noviembre de 2004.

Signos y síntomas	Nº de casos	%
Dolor abdominal	56	100,00
Fiebre	10	17,85
Flatulencia	25	44,64
Moco	30	53,57
Sangre	26	46,42
Vómito	13	23,21

Tabla 4. Títulos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica* detectada por ELISA en individuos con diarrea y en individuos asintomáticos provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre, entre noviembre de 2003 y noviembre de 2004.

Clasificación de Títulos de anticuerpos	Sintomáticos n: 360	Asintomáticos n: 120	Total
Bajos	94	24	118
Intermedios	86	7	93
Altos	64	0	64
Total	244	31	275

Tabla 5. Número de individuos diagnosticados con amibiasis confirmados por ELISA provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre, entre noviembre de 2003 - 2004.

Resultado	Microscopia	ELISA Título alto (IgG)	Manifestaciones clínicas					
			Moco		Sangre		Dolor abdominal	
			N	%	N	%	N	%
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	52	52	26	50,00	21	40,38	52	100,00
<i>E. histolytica</i>	4	4	4	100,00	4	100,00	4	100,00
Total	56	56						

Tabla 6. Frecuencia de los individuos diagnosticados con amibiasis confirmados por ELISA distribuidos por sexo provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre.

Sexo	Nº	%	Individuos con amibiasis	%
Femenino	258	53,75	30	11,63
Masculino	222	46,25	26	11,71
Total	480	100	56	11,66

Tabla 7. Frecuencia de los individuos diagnosticados con amibiasis confirmados por ELISA distribuidos por edad provenientes de los ambulatorios “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” y “Salvador Allende” de Cumaná, estado Sucre.

Sexo	N°	Individuos con amibiasis	%
< 6	136	18	13,23
6 - 8	107	22	20,56
9 - 11	98	10	10,20
> 11	139	6	4,32
Total	480	56	11,66

## DISCUSIÓN

La prevalencia de la amibiasis a nivel mundial la ha convertido, en el último siglo, en uno de los principales problemas de salud pública en países en vía de desarrollo (Reyes *et al.* 2007). Tradicionalmente, el diagnóstico de la amibiasis se realiza por microscopía óptica, sin embargo, con este procedimiento son frecuentes los reportes de falsos positivos al observar *E. dispar*, *E. coli* o macrófagos que han fagocitado hematíes, los cuales son confundidos con *E. histolytica*, en consecuencia se ha sobrediagnosticado la enfermedad (Chacín 2001).

La demostración microscópica de trofozoítos hematófagos de *E. histolytica* en muestras de heces indican amibiasis invasora, sin embargo, mediante el examen microscópico los quistes de *E. histolytica* y *E. dispar* son indistinguibles, por lo tanto, deben reportarse como el complejo *E. histolytica/E. dispar*, de tal manera, que se deben aplicar técnicas complementarias o técnicas más específicas (ELISA o PCR) no sólo para confirmar el diagnóstico de amibiasis sino para poder obtener resultados confiables sobre la prevalencia de este protozoario en la población (OMS/OPS/UNESCO 1997; Cornejo *et al.*, 1999).

En este estudio, se determinó una prevalencia 11,5% para el complejo *E. histolytica/E. dispar* mediante examen directo, esta resultó similar al ser comparada con la señalada por Mora *et al.*, (2005) en el estado Sucre, quienes obtuvieron una prevalencia de 16% para el complejo *E. histolytica/E. dispar* empleando las mismas técnicas. Sin embargo, en ciudad Bolívar se ha señalado baja frecuencia de *E. histolytica/E. dispar* en preescolares y escolares sanos de áreas urbanas y rurales (Devera 1998; Al Rumhein 2005). De igual manera, Chourio *et al.* (2002) también señalan prevalencias menores (2%) al evaluar niños sanos del estado Zulia.

Al respecto, estudios realizados a nivel internacional han reportado prevalencias variables para el complejo *E. histolytica/E. dispar*. Cornejo *et al.* (1999) en una población urbana de Lima (Callao) reportan 10% para *E. histolytica/E. dispar*. Sin embargo, Nuran *et al.* (2004) empleando preparaciones en fresco provenientes de niños de 2 a 14 años con síntomas gastrointestinales de diarrea de la Universidad de Mersin, Turquía obtuvieron una prevalencia mayor correspondiente al 20,4%.

En cuanto a la aplicación de la coloración tricrómica, el número menor de casos positivos obtenido comparando con la técnica anterior, puede ser debido a que la emisión de los parásitos en las heces no es homogénea lo cual puede ocasionar falsos negativos.

En el presente estudio, se encontró una seroprevalencia de 57,29% mediante la técnica de ELISA, lo cual evidencia la endemidad de la zona, ésta resultó más alta que las encontradas en otras investigaciones donde también se realizó análisis serológico. Téllez *et al.* (1997), en ciudad de León, Nicaragua, señalan 23% de seropositividad. En otro estudio, Braga *et al.* (1998) reportan en Brasil 24,7% de seropositividad en individuos con un promedio de edad de 14 años.

Adicionalmente, mediante la técnica de ELISA se detectó que 19,37% de los individuos estudiados presentaron títulos bajos y 24,58% presentaron títulos intermedios de anticuerpos IgG anti *E. histolytica*. Estos resultados indican, que estas personas tuvieron en algún momento contacto con el protozoario, razón por la cual algunos de ellos pudieran presentar persistencia de anticuerpos específicos. Al respecto, Viasus *et al.* (2004), señalan que en algunos individuos los anticuerpos pueden permanecer detectables hasta 11 años, lo cual se ha relacionado con la presencia de la amiba en micro úlceras o a la retención de antígenos amibianos en el sistema retículo endotelial de los individuos (Ximenez 1993; Botero y Restrepo 1998).

Otras de las razones que explicarían la alta frecuencia de títulos bajos pudieran relacionarse con: la edad, respuesta del hospedero, la fase en que se encuentra la enfermedad, el número de amibas presentes o la presencia de reactividad cruzada, ya que algunos de estos individuos pudieran estar infectados con otros enteropatógenos (Krupp 1970; Fonte 2000).

En contraste, el 42,71% de los participantes no presentaron anticuerpos, esto pudiera atribuirse al hecho que algunas de estas personas no estaban parasitadas para el momento en que se realizó el estudio o al desarrollo tardío de la producción de anticuerpos (Fonte 2000).

Con relación al estudio clínico se encontró que de los 480 individuos analizados, 120 estaban asintomáticos, en tres de estos individuos se evidenciaron quistes de *E. histolytica* /*E. dispar* mediante técnicas convencionales, sin embargo, no se detectaron anticuerpos IgG anti *E. histolytica*, dado que *E. dispar* no induce la producción de anticuerpos porque no invade la mucosa intestinal se puede inferir que estos individuos estaban parasitados por *E. dispar*. Estos resultados coinciden con los de Huston *et al.* (1999) quienes también señalan que pacientes infectados por *E. dispar* no presentan manifestaciones clínicas ni desarrollan anticuerpos a diferencia de los infectados por *E. histolytica*.

En el grupo de asintomáticos 31 individuos resultaron negativos por microscopía para el complejo *E. histolytica* /*E. dispar*, debido a que los anticuerpos detectados no se correspondían con niveles elevados se confirmó que estos individuos habían sufrido la enfermedad y mantenían persistencia de anticuerpos. De igual manera, un estudio realizado por León y Reyes (1999), en Costa Rica, demostró que 41 pacientes en los que se observaron quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* en las heces se encontraban infectados por *E. dispar*, ya que no se detectó la presencia de anticuerpos específicos anti *E. histolytica*.

A pesar que la literatura señala que los niveles séricos no guardan relación directa con la gravedad de la enfermedad, en este estudio se confirmó que en individuos sintomáticos la presencia de títulos altos de anticuerpos específicos anti *E. histolytica* esta altamente relacionado con amibiasis invasora.

Adicionalmente, en este grupo se encontraron 8 individuos con títulos altos de anticuerpos IgG anti *E. histolytica*, negativos por microscopía, presumiendo que estos resultados podrían deberse a: 1) fallas en el diagnóstico parasitológico, el cual presenta muy

baja sensibilidad, criterio compartido por muchos investigadores, se atribuye al hecho de que la emisión de *E. histolytica* en las heces es intermitente, y 2) a infecciones amibianas recientemente curadas, en las cuales la presencia de anticuerpos en niveles altos, persisten por varios meses.

La manifestación clínica más frecuente en el estudio, fue el dolor abdominal, el cual se produce cuando los trofozoítos invaden las glándulas de la pared intestinal para alimentarse de bacterias, sangre y tejidos.

Con relación a la presencia de moco y sangre en las heces se ha señalado que éstos se generan a consecuencia del proceso invasivo del protozoario, el cual estimula la secreción de un “*mucus inmaduro*” cuando se adhiere a las zonas inter glandulares de la superficie luminal (Fonte 2000). Es importante resaltar que en 10 muestras de heces la presencia de sangre no se determinó por examen macroscópico ni microscópico sino mediante la prueba de sangre oculta, por lo cual ésta debería ser considerada como una prueba complementaria para realizar el diagnóstico de amibiasis, sin embargo, es importante destacar que la ausencia de este signo no significa que el patógeno no este presente, pues la aparición de ésta va a depender de la respuesta inmune del individuo, virulencia del parásito y la fase en que se encuentre la enfermedad.

Los resultados del estudio seroepidemiológico en la población señalan que el sexo de los individuos no fue un factor determinante en la amibiasis, ya que no se registraron diferencias significativas, esta enfermedad puede afectar ambos sexos. Todos los niños están expuestos por igual a factores predisponentes como: insalubridad del medio y desconocimiento de normas higiénicas por la falta de educación, con lo cual se favorece la transmisión del parásito. Resultados similares son reseñados por Haque *et al.* (1999) en un estudio realizado en niños preescolares de Bangladesh.

Aunque algunos autores señalan que la infección por *E. histolytica* afecta ambos sexos, en la proporción 1:1, otras investigaciones han revelado mayor porcentaje de amibiasis (disentería, absceso hepático y ameboma) en el sexo masculino, en una proporción de 3:1, la cual puede ser debida a una susceptibilidad aún no determinada en el varón, relacionada con enfermedad invasiva (Kreidl *et al.*, 1999).

En esta investigación, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la amibiasis y la edad.

Se detectaron casos de amibiasis en todos los grupos de edad estudiados, sin embargo, los resultados mostraron mayor frecuencia en niños menores de ocho años, lo cual podría estar relacionado con las deficientes condiciones sanitarias del entorno. Por otra parte, la mayoría de estos niños eran escolares, los cuales son más propensos a sufrir infecciones parasitarias, ya que están en contacto con agentes contaminantes y con otros niños. En este sentido, otros autores reportan que la mayor frecuencia de infecciones en estos grupos se debe a que aún no han adquirido hábitos higiénicos necesarios para prevenir estas infecciones, ni han desarrollado inmunidad frente a determinados parásitos (Rivero *et al.*, 2001).

La presente investigación demuestra que la técnica de ELISA debe ser empleada en combinación con métodos convencionales (microscopía) y la clínica de los pacientes para realizar diagnóstico de amibiasis en individuos donde no se evidencien trofozoítos hematófagos en las heces, con lo cual se evitaría la aplicación de tratamientos innecesarios. Por otra parte, las cifras de seroprevalencia encontradas demuestran que la población evaluada, es endémica para la amibiasis y que deben existir factores de riesgo que contribuyen a la transmisión del parásito, de manera que el gobierno regional debería implementar medidas para controlar esta enfermedad, ya que ésta afecta principalmente a los niños que se encuentran en plena fase de crecimiento.

#### AGRADECIMIENTO

Al personal del laboratorio de inmunoparasitología del Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de los Andes – Mérida, y a los profesores: Leonor Mora (Dpto. de Bioanálisis UDO- Sucre) y Marcos De Donato (Dpto. de Biomedicina, IIBCA. UDO- Sucre) por la lectura crítica del manuscrito; y Al CDCHT (proyecto M. 711-01-A y M-713-0107-EM) por su importante soporte económico.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL RUMHEIN F., SANCHEZ J., REQUENA I., BLANCO Y., DEVERA R. 2005. Parasitosis intestinales en escolares relación entre su prevalencia en heces y en el lecho subungueal. *Rev. Biomed.* 16: 227-237.
- BOTERO D., RESTREPO M. 1998. Parasitosis humanas. Tercera edición. Corporación para las investigaciones biológicas. Medellín, Colombia. pp 457.
- BRAGA L., MENDONCA Y., PAIVA C., SALES A., CALVACANTE A., MANN B. 1998. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3044-3045.
- CASTAÑO A., JARABA A., GÓMEZ A., BOTERO J. 2001. Diagnóstico de absceso hepático amibiano mediante el inmunoensayo enzimático ligado a una enzima (ELISA). *Iatreia.* 14: 103-110.
- CHACÍN L., GUANIPA N., CANO G., PARRA A., ESTÉVEZ J., RALEIGH X. 1998. Epidemiologic study of intestinal parasitic infections in a rural area from Zulia State, Venezuela. *Interciencia.* 23: 241-247.
- CHACÍN L. 2001. Relevancia del reconocimiento de *Entamoeba dispar* en la amibiasis. *Invest. Clín.* 42: 1-3.
- CHACÓN Y., CASTILLO B., BETANCOURT A., ORIA L. 2004. Morbilidad de amibiasis en la Colonia Tovar durante el periodo enero-octubre del 2004. XII Congreso de la asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso venezolano de Infectología. II Simposio latinoamericano y del Caribe de infecciones de transmisión sexual. Caracas, Venezuela.
- CHOURIO G., DÍAZ I., RIVERO Z., PEÑA C., CUENCA E., CALCHI M., MOLERO E. 2002. Prevalencia de enteroparásitos en niños inmunocomprometidos e inmunocompetentes. *Kasmera.* 30: 1-18.
- CIOMS (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas). 1993. Pautas éticas internacionales para la investigación y la experimentación biomédica en seres humanos. Ginebra. 53-56.
- CORNEJO W., ESPINOZA Y., HUIZA, A., ALVA P., SUAREZ R., SEVILLA C., NAQUIRA C. 1999. Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* por ELISA en muestras fecales de una población urbana de Lima. *An. Fac. Med.* 60: 1-5.
- DEVERA R. 1998. Ausencia de *Entamoeba histolytica/E. dispar* en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. *Rev. Bioméd.* 9: 199-201.
- DIAMOND L., CLARK C. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (Emended

- Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J. Eukaryot. Microbiol. 40: 340-344.
- ESPINOSA M., MARTÍNEZ A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. Clin. Microbiol. Rev. 13: 318-331.
- FONTE L. 2000. Amebiasis: Enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. Elfos Scientiae. Cuba. pp 193.
- GÓMEZ A., LEIVA O., MARTÍNEZ M., GARDUNO G., RAMOS F., MORAN P., MELENDRO E., MUÑOZ O., XIMÉNEZ C. 1997. Prospective study of *Entamoeba dispar* infection in a cohort of mothers and their infants: Relationship to serum antibody response. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57: 530- 537.
- HAQUE R., FARUQUE A., PETRI W. JR. 1997. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. Arch. Med. Res., 28: 317-318.
- HAQUE R., ALI I., PETRI W. 1999. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. Am. J. Trop Med Hyg., 60:1031-1034.
- HENRY R. 1985. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Séptima edición. Salvat. Barcelona, España.
- HUSTON C., HAQUE R., PETRI W. 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Clin. Microbiol. 31:2845-2850.
- KREIDL P., IMNADZE P. BAIDOSHVILI L., GRECO D. 1999. Investigación de un brote de amebiasis en Georgia. Eurosurveillance. 4: 1-7.
- KRUPP I. 1970. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 57-62.
- LEÓN R., REYES L. 1999. Serología de la amebiasis en Costa Rica. Tesis. Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio: San Pedro de Montes de Oca. Costa Rica.
- LOWRY O., ROSEBROUGH N., FARR A., RANDALL R. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Clin. Chem. 193: 265-275.
- LUACES A., PICÓ T., BARRET A. 1992. The enzyme test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* by immunoenzymatic detection of histolysain. Parasitology. 105: 203-5.
- MOR, L., GARCÍA A., DE DONATO M. 2005. Prevalencia del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* en pacientes con síntomas gastrointestinales de diarrea procedentes de Cumaná, Estado Sucre. Kasmera. 33: 1-13.
- NURAN D., GONUL A., MEHMET S., CAHIT B., ARZU K., GUROL E. 2004. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in Stool Specimens by Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Mem. Inst. "Oswaldo Cruz". 99: 769-772.
- OMS/OPS/UNESCO (Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura). 1997. Informe de la OMS/OPS/UNESCO. Consulta con expertos en amebiasis. México Boletín epidemiológico. 18: 1-4.
- PÉREZ R., KRETSCHMER R. 1994. Respuesta de inmunidad humoral. Amebiasis-Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Kretschmer R. (eds). Editorial Trillas. México. págs. 119-34.
- REYES L., LEÓN R. 2002. Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amebiasis intestinal. Rev. Costarric. Cienc. Méd. 23: 1-11.
- RIVERO Z., DÍAZ I., ACURERO E., CAMACHO M., MEDINA M., RIOS, L. 2001. Prevalencia de parásitos intestinales en escolares de 5- 10 años de un instituto de municipio Maracaibo Edo. Zulia-Venezuela. Kasmera. 29: 153-170.
- SOKAL R., ROHLF J. 1969. Biometry. Freeman and Co. San Francisco. 776 pp.
- TÉLLEZ A. LINDER E., MEYER E., MORALES W. 1997. Intestinal parasitosis in León, Nicaragua. Acta Tropica. 66: 119-125.
- TUTAYA H., CERMEÑO J., CERMEÑO J. 2002. Prevalencia de amebiasis extraintestinal en el estado Bolívar, Venezuela durante el período 1996-2002. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 22(2): 1-9.

- URDANETA H., RONDÓN M., MUÑOZ M., HERNÁNDEZ M. 1995. Isolation and Axenization of the *Entamoeba histolytica* strain. *Gen.* 49: 23- 28.
- URDANETA H., RANGEL A., MARTINS S., MUÑOZ J., HERNÁNDEZ M. 1996. *Entamoeba histolytica*: fecal antigen capture immunoassay for the diagnosis of enteric amebiasis by a monoclonal antibody. *Rev. Insi. Med. Trop. Sao Paulo.* 38: 39-44.
- URDANETA H., COVA J., MOLINA S., AGUIRRE A., HERNÁNDEZ M. 1998. Evaluación inmunoquímica de cepas de *Entamoeba histolytica* venezolanas. *Kasmera.*, 26: 35-49.
- VIASUS D., PINILLA A., LÓPEZ M. 2004. Immunología del absceso hepático amebiano. *Rev. Salud Pública,* 6(suppl 1): 1-15.
- XIMENEZ C., LEIVA O., MORAN P., RAMOS F., MELENDRO E. 1993. *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87: 31-39.