

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

SOBREDIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE AMEBIASIS INTESTINAL: ENCUESTA A TÉCNICOS DE LABORATORIO

*Dra. María de los Ángeles Fernández Ferrer, Lic. Lizet Sánchez Valdez, Dr. Humberto Marín Iglesias,
Téc. Ivón Montano Goodridge, Dr. Fidel Núñez Fernández, Lic. Yury Núñez López y Dr. Luis Fonte Galindo*

RESUMEN

Empleando ENZYMEBA, procedimiento diagnóstico de amebiasis intestinal desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", se demostró que en la provincia Cienfuegos el examen microscópico de heces se asocia con un marcado sobrediagnóstico de esta parasitosis (de 424 muestras positivas a *Entamoeba histolytica*, por examen microscópico, solo 61 lo fueron por ENZYMEBA). Para incursionar en los factores que podrían estar incidiendo en la calidad del trabajo de los técnicos de laboratorio de esta provincia se aplicó a la casi totalidad de ellos (96 de 102) un cuestionario (23 preguntas) sobre diversos aspectos relacionados con este tipo de diagnóstico. El conjunto de los resultados de esta encuesta sugiere que en la calidad del diagnóstico de amebiasis intestinal por examen microscópico podría estar incidiendo, además de deficiencias técnico-organizativas y materiales, una insuficiente preparación teórica de quienes la realizan.

Descriptores DeCS: HECES/parasitología; ENTAMOEBA HISTOLYTICA/parasitología; PERSONAL DE LABORATORIO/normas; RECOLECCION DE DATOS

El diagnóstico parasitológico de amebiasis intestinal se ha basado tradicionalmente en el hallazgo de quistes o trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, en el examen microscópico de heces.¹ Este procedimiento, sin embargo, se asocia con falsos diagnósticos frecuentes.^{2,3}

En 1988, *Luaces* y *Barret*⁴ describieron una proteasa de *E. histolytica* a la que denominaron histolisina. Posteriormente, *Luaces* y otros⁵ desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (ENZYMEBA) para la detección de esta enzima (renombrada histolisina a partir de este trabajo) en he-

ces. La eficacia de este procedimiento fue probada en un estudio realizado en Mérida, México (comunicación escrita, Comisión de Expertos de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 1992).

Teniendo en cuenta las ventajas de ENZYMEBA, en especial el hecho de que sus altos índices de sensibilidad y especificidad no dependen de la subjetividad asociada con un observador,⁵ se decidió demostrar con precisión la presencia, y su cuantía, del sobrediagnóstico de amebiasis asociado con el examen microscópico de heces en la provincia de Cienfuegos. Al

mismo tiempo se quiso incursionar en los factores que podrían estar incidiendo en la calidad del trabajo de los técnicos que realizan el diagnóstico parasitológico por observación microscópica de heces. Para ello, se aplicó una encuesta a técnicos de laboratorio de esta provincia, sobre aspectos técnico-organizativos y cognoscitivos relacionados con este tipo de diagnóstico.

MÉTODOS

MUESTRAS DE HECES

Durante 5 meses se colectaron en los hospitales Clínico-Quirúrgico "Gustavo Aldereguía" y Pediátrico "Paquito González" de Cienfuegos y en casi todos los policlínicos (13 de 14) de la provincia, muestras fecales en las que habían sido detectados por observación microscópica uno o más estadios de *E. histolytica*. En todos los casos, *E. histolytica* fue identificada en las condiciones en que regularmente se realiza el diagnóstico parasitológico, por examen morfológico en estos centros asistenciales.

Todas las muestras fueron conservadas, congeladas, en las respectivas instituciones en que se realizó el diagnóstico primario, y fueron transportadas, también congeladas, al Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de la provincia Cienfuegos y de allí, en iguales condiciones, al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA PARA LA DETECCIÓN DE HISTOLISAÍNA, PROTEASA DE *E. HISTOLYTICA* (ENZYMEBA)

Una vez en el IPK, sobre todas las muestras de heces, con la intención de confirmar la presencia de *E. histolytica* en cada

una de ellas, se realizó ENZYMEBA, procedimiento para la detección en heces de este protozoo, basado en la captura de histolisaína, enzima proteolítica liberada por éste.

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

Después de 4 h en contacto con la placa a 4 °C el material no "capturado" fue desechado y tras 4 lavados con Tween-20 a 0,05 % en tampón fosfato salino (PBS) (PBS-T) en los pocillos fueron colocados 100 µL de 100 mM benziloxycarbonil L-Arginil L-Arginine 2-(4-metoxi)naphthylamida (z-arg-arg Mna) Bachem, Suiza, en solución 50 mM glicina-EDTA pH 9,5 que contenía, además, L-cisteína 2 mM.

Luego de 16 h de incubación a 37 °C, la acción de la enzima capturada fue revelada mediante la adición de 100 µL de una solución que contenía p-cloro mercuribenzoato 5 mM, Fast garnet 22,5 µg/µL, EDTA 25 mM y Tween 20 a 1 % pH 6,0. La aparición inmediata de color rosado (de diferente intensidad) fue considerada como un resultado positivo, y negativo en aquellos pocillos cuyo contenido continuó amarillo. En cada ensayo se utilizaron 2 controles (positivo y negativo).

ENCUESTA A TÉCNICOS DE LABORATORIO DE LA PROVINCIA CIENFUEGOS

En la encuesta a técnicos de laboratorio, preparada para ser aplicada al universo de éstos en la provincia de Cienfuegos, se recogieron datos generales de ellos, se indagó en conocimientos acerca de los elementos morfológicos que deben ser tenidos en cuenta para la identificación de cada uno de los estadios de *E. histolytica* y se obtuvo información sobre aspectos técnico-organizativos de la actividad de cada uno en relación con la calidad del diagnóstico parasitológico que realizan.

Para la confección de esta encuesta, que se aplicó durante el mes de septiembre de 1996, se tuvo en cuenta, además de las intenciones arriba mencionadas, la experiencia acumulada en este tipo de encuestas en el Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" y las opiniones de especialistas relacionados con el tema en cuestión.

Una vez confeccionado el cuestionario (23 preguntas), éste se sometió a criterio de expertos y la factibilidad de su empleo fue demostrada mediante la aplicación a un pequeño grupo de técnicos de similar categoría a los encuestados en el estudio. No se consideró necesario la preparación de un instructivo para la aplicación de la encuesta porque esta actividad fue realizada directamente por los autores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de comparación de proporciones para comprobar la existencia o no de diferencia estadísticamente significativa entre la eficiencia del diagnóstico en hospitales y policlínicos.

Se confeccionó una base de datos con toda la información obtenida de las encuestas mediante el programa EPI-INFO, ver-

sión 6.0, y se realizó un análisis de frecuencia de las respuestas dadas con el uso del mismo programa.

RESULTADOS

Se colectaron en los 8 municipios de la provincia Cienfuegos un total de 448 muestras de heces en las que habían sido detectados por examen microscópico uno o más estadios de *E. histolytica*. De éstas, 24 fueron descartadas por no haber sido transportadas en condiciones de congelación.

La tabla 1 muestra los resultados del estudio de la eficacia del diagnóstico morfológico en la provincia Cienfuegos. Como puede observarse, de las 424 muestras incluidas en el estudio, sólo 61 (14,4 %) fueron positivas a ENZYMEBA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la calidad del diagnóstico en los hospitales (18,2 % de eficacia) y la de los policlínicos (13,8 %) ($p > 0,05$).

TABLA 1. Resultados de la aplicación de ENZYMEBA a muestras de heces positivas a *E. histolytica* por examen microscópico en hospitales y policlínicos de la provincia Cienfuegos

	No. de muestras	ENZYMEBA positivas	Porcentaje
Hospitales	55	10	18,2
Policlínicos	369	51	13,8
Total	424	61	14,4

Como puede observarse en la tabla 2, se logró encuestar a la casi totalidad (92,4 %) de los técnicos de laboratorio que realizaban el diagnóstico parasitológico por examen microscópico de heces, durante el período en que se aplicó el cuestionario. Algunos de los encuestados no contestó la totalidad de las preguntas incluidas. Cuan-

do así ocurrió se registró el resto de las respuestas y no se anularon las encuestas.

TABLA 2. *Técnicos de laboratorio a encuestar y encuestados en los hospitales y policlínicos de la provincia Cienfuegos*

Tipo de Centro	Técnicos de laboratorio	
	a encuestar	encuestados
Hospitales	24	24
Policlínicos (municipio Cienfuegos)	35	34
Policlínicos (municipios periféricos)	43	38
Total	102	96

De los 96 técnicos encuestados, 88 (91,7 %) eran menores de 50 años y 60 (62,5 %) eran menores de 40 años de edad. Esto refleja que las personas que realizan el examen morfológico de heces son aún en consideración jóvenes, y hace pensar que no son ineptitudes físicas (visuales, ortopédicas, u otras), causas importantes de los errores diagnósticos detectados. Resultó paradójico que la inmensa mayoría de los técnicos dijeron tener más de 5 años de experiencia en el trabajo de laboratorio, en general, y en el diagnóstico parasitológico, en particular (96,9 y 94,8 %, respectivamente), lo que de cierta manera sugiere, como se demostrará más adelante, que la forma de organizar el trabajo en los años precedentes no ha permitido la acumulación de conocimientos, ni el desarrollo de habilidades suficientes para la realización de un trabajo más eficiente.

En la encuesta, 4 preguntas a los técnicos de laboratorio incursionaban en aspectos cognoscitivos de la actividad de éstos, relacionados con el diagnóstico morfológico de amebiasis. De ellos, llamó mucho la atención los bajos porcentajes de encuestados que identificaron bien el conjunto de características que correspondía a

cada uno de los estadios de *E. histolytica*: trofozoitos, 23 (35,9 %); quiste, 50 (61,7 %); prequiste, 17 (54,8 %). Sólo 28 (38,9 %) de los técnicos seleccionaron correctamente al conjunto de características morfológicas que correspondían a leucocitos. Esta última pregunta fue incluida porque, como es bien conocido, son estas células fáciles de confundir con trofozoitos de *E. histolytica*, de modo que el buen conocimiento de su estructura puede ayudar a evitar falsos diagnósticos de amebiasis.

Un grupo de preguntas de este cuestionario evaluaba aspectos técnico-organizativos del trabajo de los técnicos de laboratorio encuestados. De las respuestas, los elementos más interesantes son los que se relacionan a continuación:

- De los encuestados 81 (87,1 %) realizaban el diagnóstico parasitológico de forma rotatoria y de éstos, 38 (50 %) lo hacían con una frecuencia mensual o superior.
- Del total de técnicos encuestados sólo 19 (20,2 %) realizaban el diagnóstico parasitológico como actividad única de su jornada laboral.
- En cuanto a los materiales necesarios para posibles consultas (manuales, gráficos, esquemas, otros) la mayoría de los técnicos, 84 (90,4 %), consideró que en sus respectivos laboratorios éstos no existen o son insuficientes.
- Según refirió la mayor parte de los técnicos, en las unidades asistenciales en que laboraban no se realizaban controles de calidad internos y externos al diagnóstico parasitológico; 60 (72,9 %) y 81 (86,2 %), respectivamente.
- Sólo 8 (8,7 %) de los encuestados refirieron poseer en sus respectivos laboratorios muestras parasitológicas de referencia.

- En relación con los microscopios ópticos que empleaban, 41 (45,1 %) de los técnicos consideraron que el número de éstos en su unidad era insuficiente y 31 (34,1 %) refirieron que en el diagnóstico parasitológico se utilizaba uno de calidad insuficiente o el de peores condiciones.
- Previo a este estudio, se conoció que en ninguno de los laboratorios de los centros asistenciales de la provincia Cienfuegos empleaban métodos de concentración para mejorar la eficiencia del diagnóstico parasitológico que realizaban. Restaba entonces conocer el tipo de examen directo empleado (incluido tipo de coloración si era el caso). A la pregunta que indagaba en este aspecto, respondieron 41 (42,7 %) de los técnicos encuestados. Sólo 27 (28,1 %) de los técnicos empleaban una coloración (Lugol) que permitía una buena identificación de los núcleos de *E. histolytica*.
- De los técnicos, 48 (55 % de los que respondieron la pregunta) expresaron que en su laboratorio las muestras de heces para el diagnóstico parasitológico no se procesaban inmediatamente.

DISCUSIÓN

De las 424 muestras incluidas en el estudio, sólo 61 (14,4 %) fueron positivas a ENZYMEBA. Este resultado demuestra que existe un marcado sobrediagnóstico de amebiasis intestinal en la provincia estudiada. Aunque no con la intencionalidad ni con las herramientas del presente trabajo, un estudio muy reciente⁶ demostró que en otra provincia de Cuba, Ciudad de La Habana, también existía sobrediagnóstico de esta parasitosis. Este problema, que conduce al uso innecesario y yatrógeno de

drogas amebicidas, se reporta cada vez con más frecuencia más allá de nuestras fronteras.^{2,3,7} Para incursionar en los factores posiblemente asociados con este sobrediagnóstico de amebiasis intestinal por examen microscópico de heces, se aplicó un cuestionario sobre aspectos cognoscitivos y técnico-organizativos relacionados con este tipo de diagnóstico.

Algunos comentarios a las respuestas dadas a las preguntas que evaluaban aspectos cognoscitivos relacionados con la eficiente detección de *E. histolytica* por observación microscópica de heces, fueron realizados al exponer en el acápite anterior los resultados. Analizadas de conjunto estas respuestas, se podría concluir que en relación con estos aspectos la preparación teórica de los técnicos es insuficiente. En este sentido, se hace necesario un uso más eficiente de las actividades tradicionales de formación continuada (cursos, readiestramientos, etc.) y el desarrollo de nuevas herramientas docentes que, unidas a las ya existentes, permitan al sistema de salud disponer de técnicos más calificados.

La realización de un eficiente diagnóstico parasitológico por el personal técnico encargado de esta labor requiere, además de una suficiente acumulación e integración de conocimientos y habilidades, de adecuadas condiciones técnico-organizativas y materiales. El conjunto de los resultados de esta encuesta en relación con este segundo grupo de aspectos, hace pensar que posiblemente tras el marcado sobrediagnóstico de amebiasis demostrado en este trabajo existen, además de una insuficiente preparación teórica, deficiencias técnico-organizativas y materiales. El estudio de control de la calidad realizado en Ciudad de La Habana, al que se hizo referencia antes,⁶ también encontró algunas de las dificultades ya mencionadas.

Los autores de este trabajo, al tener en cuenta las consecuencias yatrógenas y económicas que el sobrediagnóstico de amebiasis intestinal puede tener, consideran

que, en la medida en que la situación concreta de cada lugar lo permita, deben crearse las condiciones adecuadas para atenuar las dificultades evidenciadas en este estudio.

SUMMARY

By using ENZYMEBA, a diagnostic procedure of intestinal amebiasis developed at the "Pedro Kourí" Institute of Tropical Medicine, it was proved that in the province of Cienfuegos the microscopic feces test is associated with a marked overdiagnosis of this parasitosis (of 424 samples positive to *Entamoeba histolytica* by microscopic examination, only 61 proved to be positive by ENZYMEBA). To determine the factors influencing on the quality of the lab technicians' work in this province, most of these technicians (96 of 102) answered a questionnaire containing 23 questions on different aspects related to this type of diagnosis. The results of this survey suggest that in addition to the technical, organizational, and material deficiencies the inadequate theoretical training of those who make the test may also influence on the quality of the diagnosis of intestinal amebiasis by microscopic examination.

Subject headings: FECES/parasitology; ENTAMOEBA HISTOLYTICA/parasitology; LABORATORY PERSONNEL/standards; DATA COLLECTION.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ravdin JI. Amebiasis. Clin Infect Dis 1995;20:1453-66.
2. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986;8:228-36.
3. Anaya-Velázquez FD, Sabanero-López GI. Use of Wright's stain to identify *Entamoeba histolytica* trophozoites in feces. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989;83:210-11.
4. Luaces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterisation of histolysin: the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Biochem J 1988;250:903-9.
5. Luaces AL, Pico T, Barret AJ. The ENZYMEBA test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immunoenzymatic detection of histolysin. Parasitology 1992;105:203-5.
6. Núñez FA, Ginorio DE, Finlay CM. Control de la calidad del diagnóstico coproparasitológico en la provincia de Ciudad Habana, Cuba. Cad Saúde Publ 1997;13:67-72.
7. Matijasevic EA. Amebiasis. Espectro clínico y tratamiento. Trib Med 1995;91:290-304.

Recibido: 7 de mayo de 1998. Aprobado: 9 de noviembre de 1999.

Dra. *María de los Ángeles Fernández Ferrer*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.