

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Validación en Ciudad de La Habana, Cuba, de ENZYMEBA, inmunoensayo para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces

Dr. Luis Fonte Galindo,¹ Dr. Fidel Nuñez Fernández,² Lic. Ana Margarita Montalvo Álvarez,³ Dra. Lazara Rojas Rivero,² Dra. Martha Galloso Rodríguez,⁴ Dra. Dora Ginorio Gavito,⁵ Dra. María Elena Hernández Hernández,⁶ Dra. Ada Vázquez Pérez⁷ y Dr. Aurelio Ramírez Ramírez⁵

RESUMEN

Parasitólogos de diferentes instituciones médicas de Ciudad de La Habana realizaron la validación externa de ENZYMEBA, procedimiento diagnóstico de amebiosis intestinal desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí». Para ello, fueron colectadas muestras seriadas de heces de 212 individuos sobre las que se realizó la observación microscópica (prueba de referencia) y el inmunoensayo ENZYMEBA (prueba en validación). ENZYMEBA, comparada con el examen microscópico de heces, mostró satisfactorios índices de sensibilidad y especificidad. No se observaron reacciones cruzadas con muestras de heces en que estaban presentes otros parásitos. Además, si se tiene en cuenta que para el diagnóstico de amebiosis intestinal con ENZYMEBA es suficiente una sola muestra de heces por paciente, este procedimiento pudiera ser útil en estudios de eficacia terapéutica y de prevalencia.

Descriptores DeCS: TECNICAS PARA INMUNOENZIMAS; ENTAMOEBA HISTOLYTICA/enzimología; HECES/parasitología; EFICACIA; VALOR PREDICTIVO DE LOS TESTS; PEPTIDO HIDROLASAS/análisis; CUBA.

No obstante las importantes limitaciones que le son inherentes (subdiagnóstico, cuando no es realizado de manera seriada; sobrediagnóstico, cuando no es llevado a cabo por personal debidamente entrenado) el examen microscópico se mantiene como el procedimiento de laboratorio más empleado para la detección en heces de *Entamoeba histolytica*^{1,2}

Algunas pruebas serológicas han sido útiles en el diagnóstico de las formas extraintestinales de amebiosis, en particular del absceso hepático.³ Sin embargo, las formas intestinales de esta parasitosis no han encontrado en estos exámenes una solución eficiente al problema de su diagnóstico.¹ Recientemente se han desarrollado sistemas para la detec-

¹ Especialista de I Grado en Inmunología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Especialista de I Grado en Microbiología (Parasitología). Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. IPK.

⁴ Especialista de I Grado en Microbiología (Parasitología). Hospital Militar "Carlos J. Finlay".

⁵ Especialista de I Grado en Microbiología (Parasitología). Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana.

⁶ Especialista de I Grado en Microbiología (Parasitología). Instituto de Gastroenterología.

⁷ Especialista de I Grado en Microbiología (Parasitología). Hospital Clínicoquirúrgico "Miguel Enríquez".

ción de antígenos en heces, pero éstos aún no están disponibles para su uso regular.

En 1988, *Luaces y Barret*⁶ describieron una proteasa de *E. histolytica* a la que nombraron histolisina, posteriormente renombrada histolisafina.⁷ En 1992, *Luaces* y otros⁷ desarrollaron un ensayo inmunoenzimático (ENZYMEBA) para la detección de histolisafina en las heces. Este procedimiento continúa siendo una singularidad genérica, pues es el único en el cual el propio parásito aporta la enzima (histolisafina) que revela su presencia.

Después de desarrollado el sistema, se pasó a la producción, en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) de los componentes principales de éste. Rebasada esta fase, fue necesario la validación en Cuba de la versión de ENZYMEBA, que emplea componentes producidos en el IPK. El objetivo del presente documento es reportar los resultados de ese estudio evaluativo.

MÉTODOS

EVALUADORES

Para realizar la validación de ENZYMEBA fueron invitados a las instalaciones del IPK 5 parasitólogos de reconocida experiencia en la observación microscópica de parásitos intestinales. Todos ellos recibieron un breve adiestramiento en el uso del sistema que pretendían evaluar.

MUESTRAS DE HECES

Durante 1 semana se colectaron en los Hospitales "Juan Manuel Márquez", "Carlos J. Finlay" y "Miguel Enríquez" muestras seriadas (hasta 3, tomadas en días diferentes) de 212 individuos, que, por diferentes motivos (enfermedad diarreica, exámenes de rutina, etcétera), acudieron a los respectivos servicios de parasitología de dichos centros. Todas las muestras fueron trasladadas el mismo día de su recepción en los laboratorios del IPK.

A cada muestra se le realizó observación microscópica de las heces, para la detección de parásitos intestinales, y el inmunoensayo ENZYMEBA, con vistas a detectar la presencia de *Entamoeba histolytica*. En todos los casos el trabajo se realizó a

doble ciegas; es decir, los evaluadores que llevaron a cabo la observación microscópica de las heces no conocieron de los resultados de los que realizaban ENZYMEBA, y viceversa, hasta el final del estudio evaluativo.

EXAMEN MICROSCÓPICO DE LAS HECES

El diagnóstico coproparasitológico se realizó mediante examen directo con coloración de Lugol; la observación con tinción tricrómica se reservó sólo para aquellos casos en que aún existiese dudas del diagnóstico de *E. histolytica*. Se consideró a un individuo positivo por observación microscópica cuando en 1 o más de los 3 exámenes realizados se observó la presencia de 1 o más estadios de *E. histolytica*.

INMUNOENSAYO ENZYMEBA

ENZYMEBA se realizó según reportaron *Luaces* y otros en 1992,⁷ con algunas modificaciones. Brevemente: 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; que contenía anticuerpos antihistolisafina obtenidos en conejo (5 µg/mL). Los sitios no recubiertos por los anticuerpos fueron bloqueados mediante incubación durante 2 h a 37 °C con 150 µL/ pocillo de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1 % en solución tamponada de fosfato (PBS) (0,1 M, pH 7,2). Transcurrida esta incubación se eliminó todo remanente del agente bloqueante y se añadieron las muestras de heces, por duplicado, previamente diluidas en agua destilada (1g 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 al 0,05 % en PBS, en los pocillos fueron colocados 100 µL de 100 mM Benziloxycarbonil-L Arginil-L Arginine 2-(4-metoxi) glicina-EDTA pH 9,5 que contenía, además, L-cisteína 2mM.

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 mg/mL,

EDTA 25 mM y TWEEN-20 al 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).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del inmunoensayo ENZYMEBA, se tomó como prueba de referencia, la observación microscópica de las heces realizadas a 3 muestras seriadas de cada individuo participante en el estudio. Para ello, además, se confeccionó la correspondiente tabla de contingencia de doble entrada y se empleó el procedimiento matemático reportado por *Kleinbaum* y otros en 1982.⁸

Para estudiar la concordancia existente entre ENZYMEBA y la observación microscópica de las heces se calculó el índice de concordancia de Kappa, mediante el procedimiento descrito por *Fleiss* en 1981.⁹

RESULTADOS

Entre las 212 muestras seriadas de heces, en 75 se detectaron microorganismos diferentes de *E. histolytica*, fundamentalmente parásitos; sobre estas muestras se realizó el estudio de las posibles reacciones cruzadas de ENZYMEBA. Con los resultados de los exámenes microscópicos y de ENZYMEBA a las restantes 137 muestras (28 positivos a ENZYMEBA y de éstas 27 al examen microscópico) se calcularon los índices de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos del inmunoensayo que se evaluaba. Como se muestra en la tabla 1, éstos fueron 100; 99,1; 96,4 y 100 %, respectivamente. El índice de concordancia de Kappa entre ambos procedimientos diagnósticos fue de 0,97 (sólo no coincidieron en 1 resultado).

ENZYMEBA se mantuvo positivo en las 3 muestras de 1 individuo participante en el estudio sin que en ninguna de ellas la observación microscópica permitiera el hallazgo de algún estadio de *E. histolytica*. A este caso se le administró simultáneamente metronidazol (250 mg/8 h) y furoato de diloxanida (500 mg/8 h), ambos durante 10 d. Una semana después de terminado el tratamiento se colectaron otras 3 muestras de heces de este individuo sobre los que los 2 tipos de exámenes mantuvieron resultados discrepantes (es decir ENZYMEBA, continuó positivo).

TABLA 1. Comparación de los resultados de la observación microscópica y de ENZYMEBA aplicados a muestras seriadas de 137 individuos

		Observación microscópica	
		Positiva ¹	Negativa
ENZYMEBA	Positivo ²	27	1
	Negativo	0	109

¹ Se consideró a un individuo positivo por observación microscópica cuando en 1 o más de los 3 exámenes realizados se observó presencia de *E. histolytica*.

² El inmunoensayo ENZYMEBA fue positivo en las 3 muestras seriadas de 28 individuos. Sensibilidad: 100 %. Especificidad: 99,1 %. Valor predictivo positivo: 96,4 %. Valor predictivo negativo: 100 %. Índice de concordancia de Kappa: 0,97.

El estudio de reacciones cruzadas, cuyos resultados son mostrados en la tabla 2, demostró el no reconocimiento por ENZYMEBA de otros microorganismos presentes en las heces estudiadas.

ENZYMEBA resultó positivo en el examen de las 3 muestras seriadas de 28 individuos participantes. Los resultados del examen microscópico a estas muestras se observan en la tabla 3.

Como se puede observar, la prueba morfológica sólo detecta una parte de los casos de amebiosis en cada ciclo y sólo la acumulación de positivos en las 3 muestras es la que nos permite afirmar que este examen diagnosticó 27 individuos infectados por *E. histolytica*.

TABLA 2. Ausencia de reacciones cruzadas de ENZYMEBA con otros parásitos

Parásito observado	ENZYMEBA	
	Positivo	Negativo
<i>Blastocytis hominis</i>	0	13
<i>Giardia lamblia</i>	0	11
<i>Entamoeba coli</i>	0	7
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	6
<i>Enterobius vermicularis</i>	0	7
<i>Trichuris trichiura</i>	0	13
<i>Endolimax nana</i>	0	14
Levaduras	0	4
Total	0	75

TABLA 3. Resultados de la observación microscópica realizada a 3 muestras seriadas de cada uno de los 28 individuos positivos a ENZYMEBA

Observación microscópica	Muestra		
	Primera	Segunda	Tercera
Positiva	13	11	15
Negativa	15	17	13
Positividad acumulada*	13	23	27

* Positividad acumulada significa número de casos que tras cada muestra han sido positivos en 1 o más de ellas. Por ejemplo, la positividad acumulada de 23 tras la segunda muestra significa que a los 13 positivos de las primeras se agregan otros 10 nuevos positivos con los resultados de las segundas.

DISCUSIÓN

Adentrados ya en la última década del presente siglo, la necesidad de encontrar procedimientos alternativos, o complementarios, al examen microscópico de las heces para la detección de *E. histolytica* sigue estando presente. En ese sentido, el inmunoensayo ENZYMEBA, desarrollado por Luaces y otros⁷ es un paso importante.

Los resultados de este estudio evaluativo demuestran que ENZYMEBA es un procedimiento diagnóstico de amebiosis intestinal altamente eficiente-altos índices de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia cuando se le comparó con el examen microscópico realizado a 3 muestras de heces por individuo incluido en el estudio.

Respecto al examen microscópico, ENZYMEBA mostró resultados diferentes sobre las muestras de 1 caso. Dado que esta diferencia se mantuvo tras el uso combinado de un amebicida hístico y otro luminal, es muy posible que se trate de un falso positivo del inmunoensayo en estudio.

ENZYMEBA, no obstante, confirmó su alta especificidad al registrar resultados negativos cuando se le empleó con muestras de heces en las que estaban presentes otros parásitos intestinales.

Muy interesante nos fue conocer que ENZYMEBA resultó positivo en 28 individuos desde la primera muestra. En 27 de ellos el examen microscópico tuvo igual resultado, pero fue necesario la observación de las 3 muestras de cada participante. Es decir, ENZYMEBA fue capaz de detectar la infección, aún en aquellas muestras en que no se detectaron desde el primer momento quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica*. Este hecho, que posi-

blemente obedezca a la secreción de histolisina durante el tránsito intestinal de este protozoo, apunta hacia el uso de ENZYMEBA no sólo como herramienta diagnóstica, sino también en estudios de prevalencia y de eficacia terapéutica, pues sería suficiente el estudio de 1 muestra por individuo.

SUMMARY

Parasitologists from different medical institutions in Havana City carried out the external validation of ENZYMEBA, a diagnostic procedure of intestinal amebiasis developed at the «Pedro Kourí» Institute of Tropical Medicine. To this end, serial faeces specimens from 212 individuals were collected and observed on the microscope (reference test). The ENZYMEBA immunoassay (validation test) was also made. On comparing ENZYMEBA with the microscopic examination, satisfactory indexes of sensitivity and specificity were found. No cross-reactions were detected in faeces specimens, where found other parasites were present, too. Taking into account that only one faeces specimen per patient is enough for the diagnosis of intestinal amebiasis with ENZYMEBA, this procedure may be useful in studies of therapeutical efficacy and prevalence.

Subject headings: IMMUNOENZYME TECHNIQUES; ENTAMOEBA HISTOLYTICA/ enzymology; FECES/parasitology; EFFICACY; PREDICTIVE VALUE OF TESTS; PEPTIDE HYDROLASAS/analysis; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Ravdin JI. Amebiasis. *Clin Infect Dis* 1995;20:1453-66.
3. Madison SE. Serodiagnosis of parasitic diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:457-69.
4. González-Ruiz A, Haque R, Rheman T, Aguirre , Castanon G, Hall A, et al. Further diagnosis use of an invasive-specific monoclonal antibody against *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1992;23:281-3.
5. Abd-Alla MD, Jackson TF, Gathiran V. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol* 1993; 31:284-50.
6. Luaces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin: the major cystein proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 1988;250:903-9.
7. Luaces AL, Picó T, Barret AJ. The ENZYMEBA test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immunoenzymatic detection of histolysin. *Parasitology* 1992;105:203-5.
8. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstein H. Epidemiologic research. Principles and quantitative methods. New York: Van Nostrand Reinhold 1992:221-2
9. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2 ed. New York: Wiley and Son, 1981:212.

Recibido: 21 de marzo de 1997. Aprobado: 10 de julio de 1997.
Dr. Luis Fonte Galindo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.