

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

CENTRO DE INVESTIGACIONES MEDICOQUIRÚRGICAS

CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA

Eficacia antiamebiana del metronidazol demostrada en un estudio realizado en la provincia de Cienfuegos

Dr. Luis Fonte Galindo,¹ Dra. María de los Ángeles Fernández Ferrer,² Lic. Lizet Sánchez Valdés,³ Dr. Humberto Marín Iglesias,⁴ Téc. Ivón Montano Goodridge⁵ y Dr. Jorge Luis Maestre Mesa⁶

RESUMEN

Se realizó una serie de 3 estudios en la provincia de Cienfuegos para demostrar que la amebiasis intestinal en Cuba podría ser un problema de salud sobredimensionado. Con los 2 primeros, se demostraron 2 componentes de esta sobredimensión: el sobrediagnóstico microscópico y el desconocimiento de la presencia de *Entamoeba dispar*, especie no patógena, en muchos de los casos en que la observación microscópica fue correcta. Aquí se reportó el estudio que demuestra el tercer componente: la creencia errónea de que existe resistencia de *Entamoeba histolytica* al metronidazol. Para ello, a 35 individuos con infección por una o ambas especies del complejo *E. histolytica* / *E. dispar* se les administró metronidazol a la dosis de 250 mg 3 veces al día, durante 10 d. A muestras de heces colectadas inmediatamente después del tratamiento se les aplicó la prueba ENZYMEBA, para detectar la presencia de una o ambas especies del complejo *E. histolytica* / *E. dispar*, y un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa múltiple, para precisar la especie presente. Los resultados de la aplicación de estos ensayos permitieron comprobar la desaparición de la infección por *E. histolytica* en todos los casos y, por lo tanto, concluir que en aquella provincia, como posiblemente en el resto del país, el metronidazol continúa siendo una droga eficaz en el tratamiento de la amebiasis intestinal.

DeCS: DISENTERIA AMIBIANA/quimioterapia; METRONIDAZOL/uso terapéutico; TECNICAS PARA INMUNOENZIMAS; CUBA.

Entre 1993 y 1994 se realizó en Ciudad de La Habana un estudio de control de calidad del diagnóstico de amebiasis intestinal por observación microscópica de heces. En esta tarea se utilizó como prueba comparativa el procedimiento ENZYMEBA, inmunoensayo para la detección en heces de histolisina, proteasa excretada por *E. histolytica*.^{1,2} Los resultados del estudio demostraron que el examen microscópico de heces

estaba asociado a un importante sobrediagnóstico de amebiasis intestinal.³

Mientras se realizaba el estudio descrito en el párrafo anterior, la conjunción de viejas y nuevas evidencias sugirieron que el problema podría ir más allá del sobrediagnóstico microscópico de esta parasitosis.⁴⁻⁸ Por aquellos años, partiendo de criterios bioquímicos, inmunológicos y genéticos, quedó demostrado que existen 2 especies de

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

² Especialista de I Grado en Microbiología. Centro de Investigaciones Medicoquirúrgicas (CIMEQ).

³ Máster en Epidemiología. Licenciada en Matemáticas. IPK.

⁴ Especialista de I Grado en Microbiología. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Cienfuegos.

⁵ Técnica en Química. IPK.

⁶ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

amebas morfológicamente indistinguibles.⁹ Una de ellas, *Entamoeba histolytica*, es responsable de la llamada amebiasis. La otra, *Entamoeba dispar*, parece no ser patógena.

Esta novedad taxonómica conducía a 2 consideraciones prácticas: la primera, que aun bien realizado el diagnóstico microscópico, y sobre todo cuando se identificaban quistes, las amebas observadas podrían corresponder a la especie *E. dispar* y, en consecuencia, no tratarse de un caso de amebiasis; la segunda, que los supuestos casos de resistencia amebiana al metronidazol podrían en realidad tratarse de pacientes que acudieron a los servicios hospitalarios por presentar diarreas, se les indicó un examen microscópico de heces para confirmar la sospecha clínica y este resultó en un falso diagnóstico de amebiasis intestinal (bien porque se confundieron con amebas estructuras presentes en las heces, bien porque se informó la presencia de *E. histolytica* en una muestra en que la ameba presente era *E. dispar*). En cualquier caso, el paciente regresa con los síntomas iniciales, porque se le indicó tratamiento para una enfermedad que no padecía.

El conjunto de elementos hasta aquí descritos sugirió que la amebiasis intestinal en Cuba podría ser un problema de salud sobredimensionado (porque se sobrediagnostica, porque se desconoce la existencia de *E. dispar* y porque se considera erróneamente que existe resistencia de *E. histolytica* al metronidazol). Con el objetivo de hacer una valoración integral de esta sobredimensión, y de sus posibles componentes, se realizó una serie de 3 estudios en la provincia de Cienfuegos. Con los 2 primeros, se demostraron 2 componentes de esta sobredimensión: el sobrediagnóstico microscópico¹⁰ y el desconocimiento de la presencia de *E. dispar* en muchos de los casos en que la observación microscópica fue correcta.¹¹ Aquí se reporta el estudio que demuestra que en aquella provincia, como posiblemente en el resto del país, el metronidazol continúa siendo una droga eficaz en el tratamiento de la amebiasis intestinal.

MÉTODOS

I. Muestras

Este estudio es el último de una serie de 3, realizados para demostrar los 3 componentes de la sobredimensión citada arriba. Para la realización de la serie, muestras de heces, hasta

un número de 424, fueron colectadas de individuos que por diferentes razones, entre ellas padecer de diarreas, acudieron a los servicios médicos de 2 hospitales y 13 policlínicos de la provincia de Cienfuegos, entre los meses de mayo y septiembre de 1996. En estas muestras, el personal técnico de esas unidades de salud había detectado, por los procedimientos de rutina utilizados para el examen microscópico de heces, la presencia de quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica*.

Todas las muestras fueron congeladas a -20 °C y enviadas a los laboratorios de parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). En estos laboratorios, para confirmar o negar la infección por microorganismos del complejo *E. histolytica* / *E. dispar*, a cada muestra se le aplicó el inmunoensayo ENZYMEBA. Para precisar la especie amebiana presente en las muestras positivas a ENZYMEBA, estas fueron estudiadas mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) múltiple.

A 35 individuos con infección confirmada por una o ambas especies del complejo *E. histolytica* / *E. dispar* (11 infección mixta y 14 infección por *E. dispar*), a los que sus respectivos médicos de asistencia les habían indicado tratamiento con metronidazol, se les tomó una segunda muestra de heces inmediatamente después de finalizado. A estas muestras postratamiento, que también fueron congeladas a -20 °C y trasladadas a los laboratorios del IPK, se le aplicaron los procedimientos ENZYMEBA y RCP.

II. ENZYMEBA

El ensayo inmunoenzimático ENZYMEBA, empleado en este estudio para confirmar o negar la infección por microorganismos del complejo *E. histolytica* / *E. dispar*, antes y después del tratamiento, es producido y comercializado en forma de juego diagnóstico por el IPK. Este procedimiento fue realizado de acuerdo con las instrucciones del productor, basadas en la metodología descrita por Luaces y otros.¹

III. RCP múltiple

Para precisar la especie presente en las muestras positivas a ENZYMEBA, antes y después

TABLA. Resultados de la aplicación de los procedimientos ENZYMEBA y RCP múltiple a muestras de heces, tomadas antes y después del tratamiento con metronidazol

N	Pretratamiento		N	Postratamiento	
	ENZYMEBA	RCP		ENZYMEBA	RCP
24	+	+ para <i>E. dispar</i>	22	-	-
			2	+	+ para <i>E. dispar</i>
11	+	+ infección mixta	7	-	-
			4	+	+ para <i>E. dispar</i>
35			35		

del tratamiento, se aplicó a estas un procedimiento de RCP. Esta prueba, diseñada y normalizada especialmente para esta serie de estudios permite la realización simultánea de 2 pruebas de RCP (de aquí la denominación de RCP múltiple), una para detectar *E. histolytica* y otra para detectar *E. dispar*. Este ensayo fue realizado según metodología descrita en la publicación, que reporta los resultados del segundo estudio de la serie de 3 realizada en la provincia de Cienfuegos.¹¹

Las condiciones del ensayo fueron optimizadas para el desarrollo simultáneo de 2 reacciones no relacionadas, mediante el empleo de una mezcla de 2 pares de cebadores específicos para cada especie. Cada par de cebadores daría lugar a un producto amplificado electroforéticamente distinguible del otro debido a sus diferentes tamaños moleculares: 96 pares de bases el correspondiente a *E. dispar* (EdP1/2) y 132 pares de bases el correspondiente a *E. histolytica* (EhP 1/2). La construcción de los cebadores estuvo basada en las secuencias reportadas P145 de *E. histolytica* y B133 de *E. dispar* repetidas en sucesión en los respectivos ADN circulares extracromosomales.¹²⁻¹⁴ Estas secuencias están presentes exclusivamente en sus respectivas especies y, en consecuencia, son útiles en la caracterización genética. Las secuencias de los cebadores fueron: EdP1: 5´-ATG GTGAGGTTGTAGCAGAGA, EdP2: 5´-CGAT ATTGGATACCTAGTACT, EhP1: 5´-CGATT TCCC AGTTAGAAATTA y EhP2: 5´-CAAAA TGGTC GTCGTCTAGGC.

IV. Tratamiento

A los 35 individuos con infección confirmada por una o ambas especies del complejo *E. histolytica* / *E. dispar* se les había indicado, por parte de sus

respectivos médicos de asistencia, tratamiento con metronidazol a la dosis de 250 mg, 3 veces al día, durante 10 d (Laboratorio Orlando Gutiérrez, Ciudad de La Habana, Cuba).

RESULTADOS

A 35 individuos positivos a infección por *E. histolytica* / *E. dispar*, a los cuales se les había indicado tratamiento con metronidazol, se les tomó una segunda muestra de heces inmediatamente después de finalizado. Estas muestras fueron estudiadas por los procedimientos ENZYMEBA y RCP. Como se aprecia en la tabla, las muestras de 6 individuos permanecieron positivas a ENZYMEBA después del tratamiento. Cuando se les aplicó la prueba de RCP múltiple a estas 6 muestras, todas fueron positivas a *E. dispar* y ninguna lo fue a *E. histolytica*. Es decir, se observó que en todos los casos desapareció la infección por *E. histolytica*.

DISCUSIÓN

El número de drogas a las que se les ha demostrado actividad antiamebiana es amplio y los esquemas en que estas han sido utilizadas son variados.¹⁵ De ellas, pese a 2 reportes de fallas terapéuticas en el tratamiento del absceso hepático amebiano en la década de los años 70,^{16,17} el metronidazol continúa siendo el más universalmente empleado en el tratamiento de todas las formas clínicas de amebiasis invasiva.¹⁵

En la casuística de este estudio, en la que el metronidazol fue la droga antiamebiana utilizada, se observó que la infección por *E. histolytica*

desapareció en todos los casos y que 6 individuos permanecieron infectados por *E. dispar*. Esta incapacidad del metronidazol para eliminar la infección por *E. dispar* en todos los casos, se explica si se tiene en cuenta la localización de la acción de esta droga (fundamentalmente hística y parcialmente luminal)¹⁵ y la permanencia exclusiva de esta especie en el lumen intestinal.¹⁸ Este resultado demuestra que en la provincia de Cienfuegos, como posiblemente en el resto del país, el metronidazol continúa siendo una droga eficaz en el tratamiento de la infección por *E. histolytica*.

Con este trabajo se completa una trilogía con la cual se corrobora la percepción inicial de este equipo de trabajo, de que la amebiasis intestinal en Cuba, como posiblemente en otros países, podría estar siendo un problema de salud sobredimensionado (porque se sobrediagnostica microscópicamente, porque se desconoce la posible presencia de *E. dispar* en mucho de los casos en que la observación microscópica fue correcta y porque se considera erróneamente que existe resistencia de *E. histolytica* al metronidazol).

La sobredimensión de la amebiasis intestinal como problema de salud tiene 2 importantes consecuencias:

1. El desarrollo de acciones yatrógenas respecto al paciente (postergación del tratamiento de la dolencia que realmente padece, daño de la flora bacteriana intestinal por efecto de un tratamiento antiamebiano).
2. La incursión en gastos innecesarios (en medicamentos, en usos de los servicios hospitalarios, en el retardo de la reincorporación del paciente a sus actividades habituales). Los resultados de esta serie de estudios acercan al mejor conocimiento de esta sobredimensión y pone a todos en condiciones de realizar las acciones necesarias para su superación.

SUMMARY

Three studies were conducted in Cienfuegos province to prove that intestinal amebiasis in Cuba could be an overestimated health problem. The first two studies showed two components of this overestimation: microscopical overdiagnosis and lack of knowledge about *Entamoeba dispar*, a non-pathogenic species, in most cases in which microscopical examination was correct. This paper reported the third study that showed the third component: the wrong belief that *Entamoeba histolytica* is resistant to metronidazole. Thirty-five individuals infected with

one or both species of *E-histolytica-E.dispar* combination were given metronidazole at a dose of 250 mg three times daily for 10 days. Stool samples taken immediately after the treatment were tested by ENZYMEBA to detect one or both species and by a multiplex polymerase chain reaction procedure to determine the existing species. The results of these assays revealed that *E.histolytica* infection disappeared in all the cases, therefore, we may conclude that in Cienfuegos province and probably in the rest of the country, metronidazole remains an effective drug in the treatment of intestinal amebiasis

Subject headings: DYSENTERY AMEBIC/drug therapy; METRONIDAZOLE/therapeutic use; IMMUNOENZYME TECHNIQUES, CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Luaces AL, Picó T, Barret AJ. The ENZYMEBA test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immunoenzymatic detection of histolysain. *Parasitology* 1992;105:203-5.
2. Fonte L, Núñez F, Montalvo AM, Rojas L, Galloso M, Ginorio D, et al. Validación en Ciudad de La Habana, Cuba, de ENZYMEBA, inmunoensayo para la detección en heces de *Entamoeba histolytica*. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50:18-21.
3. Fonte L, Montalvo AM, Alberti E, Núñez F, Rojas L. Overdiagnosis of intestinal amoebiasis associated to serial microscopical examination of faeces. Some precisions on a problem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:799-800.
4. Sargeant PG, Williams JE, Grene JE. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:86-9.
5. Gathiram V, Jackson T. Frequency of distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South Africa population. *Lancet* i 1985:719-21.
6. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5118-22.
7. Patri WA. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990;58:1802-6.
8. Clark CG, Diamond L. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991;49:297-302.
9. Diamond L, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Ent Microbiol* 1993;40:340-4.
10. Fonte L, Fernández MA, Sánchez L, Marín H, Núñez YO, Montano I. Demostración, mediante ENZYMEBA, del sobrediagnóstico de amebiasis intestinal asociado al examen microscópico de heces. Reporte de un estudio en Cienfuegos, Cuba. *Rev Braz Pat Trop* 1998;27:193-9.
11. Núñez YO, Fernández MA, Torres D, Silva JA, Montano I, Maestre JL, et al. Multiplex PCR amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am J Trop Med Hyg* 2001;55:in press.
12. Garfinkel LI, Giladi M, Huber M, Gitler C, Mirelman D, Revel M, et al. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immunol* 1989;57:926-31.

13. Huber M, Koller B, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S, et al. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* 1989;32:285-96.
14. Bracha R, Diamond LS, Akers JP, Burchard GD, Mirelman D. Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1990;28:680-4.
15. Fonte L. Tratamiento de la amebiasis. En: Fonte L, ed. *Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control*. La Habana: Edit Elfos Scientiae; 2000:p.149-69.
16. Griffin FM. Failure of metronidazol to cure hepatic abscess. *N Engl J Med* 1973;228:1397-9.
17. Koutsaimanis KG, Timms PW, Ree GH. Failure of metronidazol in a patient with amebic hepatic abscess. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:768-71.
18. Fonte L. *Entamoeba histolytica*. Factores de Virulencia. En: Fonte L, ed. *Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control*. La Habana: Edit Elfos Scientiae; 2000:P.51-61.

Recibido: 15 de julio de 2001. Aprobado: 20 de noviembre de 2001.

Dr. *Luis Fonte Galindo*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.