

REACCIONES SEROLOGICAS EN PACIENTES CON AMIBIASIS

M. RESTREPO, F. DE RESTREPO, D. BOTERO

INTRODUCCION

Es bien conocido que el diagnóstico de certeza de una infección amibiana se hace mediante la demostración de la **Entamoeba histolytica**. Por diversas razones el hallazgo e identificación del parásito no siempre es posible, especialmente en la amibiasis extraintestinal, en la cual la visualización de los trofozoitos se hace en un reducido porcentaje de casos, con excepción de la amibiasis cutánea.

Desde 1905 se ha tratado de desarrollar procedimientos orientados a la demostración directa e indirecta de este protozoo cuando se sospecha la enfermedad en un paciente (1). La búsqueda de anticuerpos circulantes mediante técnicas serológicas son los métodos indirectos más desarrollados. Craig (2, 3) en 1927 estableció una reacción de fijación de complemento utilizando por primera vez como antígeno, un extracto alcohólico de amibas cultivadas en un medio especial. Las dificultades en la preparación de un

antígeno purificado y libre de bacterias, hicieron que varias reacciones serológicas fueran poco específicas (4 - 6). Cuando Diamond (7) en 1961 consiguió el crecimiento de **E. histolytica** en un medio axénico, se dió el paso decisivo para la preparación de un antígeno con un alto grado de pureza y por lo tanto el desarrollo de reacciones con mayor especificidad (8, 9).

A pesar del mejoramiento en los métodos serológicos, la interpretación de las reacciones es difícil, especialmente en las zonas endémicas. Esta razón motivó el presente estudio, el cual tuvo por objeto: a) adquirir experiencia en la determinación de los niveles de anticuerpos circulantes en pacientes con diferentes formas clínicas de amibiasis; b) comparar la sensibilidad de cuatro técnicas serológicas diferentes, en pacientes de una zona endémica y c) establecer la relación entre los hallazgos serológicos, la sintomatología y los exámenes parasitológicos.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio se seleccionaron 135 pacientes separados en cinco grupos así: con amibiasis intestinal aguda 58; con amibiasis intestinal crónica ó asintomática 35; con absceso hepático 30; con amibiasis genital 2 y personas sin amibas en

Drs.: Marcos Restrepo, Fabiola de Restrepo y David Botero: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Solicitud de separatas al Dr. Restrepo.

exámenes de materias fecales 10.

A cada uno de los pacientes se le hizo inicialmente una corta historia clínica y se le buscó la presencia de **E. histolytica**. Para hacer el diagnóstico de amibiasis intestinal se le practicó a cada uno examen coprológico directo y por concentración según el método de Ritchie (10), para buscar quistes o trofozoitos de **E. histolytica**. En los casos sospechosos de absceso hepático, se trató de confirmar el diagnóstico mediante exámenes directos y cultivos del pus obtenido por punción, para buscar el parásito; además se les practicaron los mismos exámenes coprológicos anotados anteriormente. En los pacientes con amibiasis genital el examen directo demostró las formas trofozoíticas del parásito. Las 10 personas del grupo control se declararon como negativas después de hacerles tres exámenes coprológicos con sus correspondientes concentraciones.

Cada uno de los individuos estudiados fué sangrado por punción venosa y en el suero se practicaron las siguientes reacciones serológicas: fijación de complemento (F.C.), hemaglutinación indirecta (H. I.), inmunodifusión cruzada en gel de agar (I.D.) y prueba del látex (P.L.). Para las tres primeras pruebas se utilizó antígeno obtenido de cultivos axénicos de **E. histolytica** (Parke Davis, Detroit, Michigan, U.S.A.), preparado de un sobrenadante de amibas lavadas y lisadas por ultrasonificación; el polvo liofilizado representa el equivalente de 0.1 ml. de una solución que contiene 7×10^6 amibas por ml. con un total de contenido de nitrógeno de 1.86 mgs/ml. La restitución del antígeno liofilizado se hizo con 0.1 ml. de agua bidestilada.

La F. C. se hizo de acuerdo a la técnica cuantitativa adoptada y estandarizada por el Centro Nacional de Enfermedades Comunicables de los Estados Unidos (11) y con las recomendaciones de Kessel y cols. (8) para el diagnóstico serológico en la amibiasis. La dilución óptica del antígeno en esta reacción fué de 1:128.

Para la H. I. se siguió el procedimiento de Kessel y cols. (8), utilizando el antígeno con una dilución óptica de 1:80.

En la prueba I. D. se emplearon placas de vidrio de 50x50 mm. con agar Noble (Difco Laboratories Detroit, U.S.A.) al 0.9%, a las cuales se les

hizo una excavación central de 3 mm. de diámetro y 6 periféricas de igual tamaño, a una distancia de 4 mm. unas de otras. En el centro de la preparación se colocó 0.01 ml. del antígeno reconstituido pero sin diluir. En la periferia se pusieron los sueros sin diluir. La placa se guardó durante 24 horas en una cámara húmeda, a temperatura ambiente. La lectura se hizo buscando una ó más bandas de precipitado, para considerarla positiva.

Para la P. L. se empleó el producto Serameba® (Ames Company, Division Miles Laboratories, Indiana, U. S. A.) que consiste en un antígeno liofilizado purificado, para sensibilizar una suspensión de látex y posteriormente mezclar con 0.2 ml. del suero del paciente; técnica basada en las pruebas desarrolladas por Morris y cols. (12, 13) en 1970. La prueba se leyó positiva ó negativa, según que apareciera o no la aglutinación de las partículas del látex con el suero problema.

En todas las reacciones se utilizaron controles positivos o negativos. La interpretación de los títulos en las reacciones cuantitativas, se hizo de acuerdo a lo propuesto por Thompson y cols. (14) en la siguiente forma:

F.C. Negativos: Títulos menores de 1:8	
Títulos bajos:	1: 8 a 1: 16
Títulos moderados:	1:32 a 1:128
Títulos altos: mayores de	1:128
H.I. Negativos: títulos menores de 1: 8	
Títulos bajos:	1: 8 a 1: 32
Títulos moderados:	1:64 a 1:512
Títulos altos: mayores de	1:512

RESULTADOS

En la Tabla 1 se aprecian los resultados de los 133 pacientes estudiados con la F.C. En aquellos con amibiasis intestinal aguda y crónica ó asintomática, más del 70% tuvieron anticuerpos fijadores del complemento con títulos por encima de 1:32, es decir, moderados ó altos. Recalcamos además que en pocos pacientes que presentaban ambas formas de amibiasis se observaron reacciones negativas (5.7% y 5.2% respectivamente) no obstante haber encontrado **E. histolytica** en sus materias fecales. De los 30 pacientes con absceso hepático, 22 (73.3%) presentaron esta reacción con títulos altos; éstos

fueron: de 1:2048, ó más elevados.

Tabla 1- *Reacción de fijación de complemento para Entamoeba Histolytica en 133 pacientes.*

Formas Clínicas	No. de Casos	TITULOS								S. A. C. *	
		Negativos		Positivos							
		No.	%	Bajos		Moderados		Altos			
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Amibiasis Crónica	35	2	5.7	2	5.7	14	40.0	12	34.3	5	14.3
Amibiasis Aguda	58	3	5.2	4	6.9	21	36.2	25	43.1	5	8.6
Absceso Hepático	30	3	10.0	0	0.0	5	16.7	22	73.3	0	0.0
Sin amibas (Control)	10	0	0.0	10	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	133	8	6.0	16	12.0	40	30.1	59	44.4	10	7.5

* *Sueros Anticomplementarios.*

Es interesante anotar que los 10 pacientes que formaban el grupo control sin amibas, presentaban títulos bajos, entre 1:8 y 1:16. Del total de sueros probados con la reacción de F. C., 10 fueron anticomplementarios.

La reacción de H.I. (Tabla 2) mostró mayor positividad que la F.C., aunque los títulos altos fueron menos frecuentes, con excepción de los abscesos hepáticos que tuvieron títulos altos en el 76.7%; en este grupo 17 casos presentaron niveles de anticuerpos por encima de 1:2048, con un máximo de 1:32708 en uno de ellos.

Tabla 2 - *Reacción de hemaglutinación indirecta para Entamoeba Histolytica en 131 pacientes.*

Formas Clínicas	No. de Casos	TITULOS							
		Negativos		Positivos					
		No.	%	Bajos		Moderados		Altos	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Amibiasis Crónica	33	6	18.2	13	39.4	13	39.4	1	3.0
Amibiasis Aguda	58	11	19.0	16	27.6	26	44.8	5	8.6
Absceso Hepático	30	6	20.0	0	0.0	1	3.3	23	76.7
Sin amibas (Control)	10	8	80.0	2	20.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	131	31	23.7	31	23.7	40	30.5	29	22.1

Los trofozoitos de *E. histolytica* se encontraron en el pus obtenido por punción en 11 pacientes, en el resto de los pacientes aunque

había pus no se observaron parásitos, por lo tanto no podemos asegurar que sean de origen amibiano. En ninguno de los pacientes se observaron amibas en materias fecales.

Los resultados obtenidos (Tabla 3) en 11 pacientes fueron los siguientes: 7 tuvieron tanto la F. C. como la H. I., fuertemente positiva, 1 tuvo la H. I. negativa pero la F. C. positiva y en

Tabla 3 - *Comparación de los resultados en los pacientes con amibiasis extraintestinal*

Localización	Trofozoitos E. Histolytica	F. C. Título	H. I. Título	I. D. Bandas	Látex
Hepática					
1	-	128	1024	0	-
2	-	512	8192	1	++++
3	+	256	8192	0	++
4	-	256	4096	0	-
5	+	512	16384	1	++++
6	-	2048	32708	1	++++
7	-	256	1024	0	++
8	-	256	2048	0	++
9	-	512	4096	0	++++
10	+	256	2048	0	++++
11	-	2048	16384	0	++++
12	+	1024	4096	0	++++
13	-	4096	8192	1	++++
14	-	2048	4096	1	++++
15	-	0	0	0	-
16	+	64	4096	2	+++
17	-	256	512	0	++
18	-	2048	16384	1	+++
19	-	64	2048	0	-
20	-	1024	2048	1	++
21	+	2048	2048	1	++++
22	-	1024	8192	1	++++
23	-	0	0	0	+++
24	-	256	0	0	+++
25	+	1024	128	0	++++
26	+	1024	2048	0	++++
27	+	0	0	1	+++
28	+	256	1024	2	+++
29	+	128	0	1	++
30	-	32	0	0	-
Genital					
1	+	256	64	1	++++
2	+	128	512	1	++++

otro ambas fueron negativas. La prueba de I. D. (Tabla 4) demostró mayor número de casos con positividad fuerte en los pacientes con absceso hepático (46.7%), que aquellos que presentaban amibiasis aguda y crónica ó asintomática (15.5% y 2.9% respectivamente). De los 13 abscesos hepáticos que tuvieron positiva la I. D. (Tabla 3), 6 correspondían a pacientes con *E. histolytica* en el pus; los 2 pacientes con amibiasis genital (Tabla 3) tuvieron la misma prueba positiva. Ninguno de los individuos controles presentaron la reacción positiva.

Tabla 4 - Prueba de Inmunodifusión en agar para *Entamoeba Histolytica* en 133 pacientes.

Formas Clínicas	No. de Casos	Negativos		Positivos Débiles		Positivos Fuertes	
		No.	%	No.	%	No.	%
Amibiasis Crónica	35	34	97.1	0	0.0	1	2.9
Amibiasis Aguda	58	49	84.5	0	0.0	9	15.5
Absceso Hepático	30	16	53.3	0	0.0	14	46.7
Sin amibas (Control)	10	10	100.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	133	109	81.9	0	0.0	24	18.1

En la Tabla 5 se observan los resultados con la P. L. Como en las pruebas anteriores, el porcentaje mayor de positividad fuerte correspondió a los abscesos hepáticos (66.6%). Las amibiasis intestinales aguda y crónica ó asintomática, tuvieron cifras de 43.1% y 45.7% respectivamente. El grupo de personas sin parásitos presentó reacciones débiles en el 20% de los casos.

Tabla 5 - Prueba del Latex para *Entamoeba Histolytica* en 133 pacientes.

Formas Clínicas	No. de Casos	Negativos		Positivos Débiles		Positivos Fuertes	
		No.	%	No.	%	No.	%
Amibiasis Crónica	35	9	25.7	10	28.6	16	45.7
Amibiasis Aguda	58	23	40.0	10	17.2	25	43.1
Absceso Hepático	30	5	16.7	5	16.7	20	66.6
Sin amibas (Control)	10	8	80.0	2	20.0	0	0.0
TOTAL	133	45	33.8	27	20.3	61	45.9

Si consideramos separadamente los pacientes con absceso hepático y amibiasis genital y comparamos los resultados de las diferentes reacciones (Tabla 3) se puede ver que hay una buena correlación en aquellos pacientes con títulos muy elevados. En los dos casos de amibiasis genital llama la atención que los títulos no fueron muy altos.

DISCUSION

En general, las pruebas serológicas se han considerado de difícil interpretación pues así como se observan pacientes con amibas y con anticuerpos, los mismos autores encuentran pacientes con amibas y sin anticuerpos ó viceversa (15-19).

Las experiencias con las primeras pruebas serológicas y la falta de concordancia con la clínica llevaron a considerar las reacciones serológicas como poco valiosas. Si se tiene en cuenta que la *E. histolytica* se comporta en el huésped con una virulencia que va desde simple comensal hasta altamente invasora (20, 21), es fácilmente comprensible que la extensión de los tejidos invadidos sea muy variada. Por esta razón la cantidad de antígeno presente y capaz de estimular la formación de anticuerpos varía ampliamente, lo cual se refleja en las reacciones serológicas. Los anticuerpos aparecen únicamente cuando hay invasión a los tejidos y persisten durante algún tiempo aunque la amiba haya desaparecido. Por esa razón la presencia de anticuerpos indica una invasión del parásito presente ó pasada y un resultado negativo prácticamente está negando la invasión aunque las amibas existan en la luz intestinal (15, 21). En nuestros pacientes los anticuerpos fueron detectados con mayor frecuencia con todas las reacciones serológicas, en las amibiasis hepáticas y con menor frecuencia en las amibiasis crónicas ó asintomáticas, indicándonos que estas últimas corresponden a infecciones poco invasoras. Igualmente existe una relación entre los títulos altos y el grado de invasión, como lo observaron experimentalmente Neal y col. (22); ésto se comprobó en nuestros pacientes con abscesos hepáticos amibianos en los cuales claramente se entiende que hay una gran invasión de los tejidos.

La técnica de H. I. fué la prueba más sencilla y por lo tanto la mejor indicadora de infección, presente o reciente. Con esta prueba solamente se observa correlación con la clínica cuando se encuentran títulos elevados (18, 19).

Algunos autores (15, 23 - 26) han descrito buena correlación entre la amibiasis invasora y reacciones positivas con la I. D. y han considerado esta prueba como un método específico de diagnóstico aunque menos sensible que las demás pruebas.

Otros autores consideran en forma similar la I. D. y la P. L. (12, 13, 27). Sin embargo en nuestros pacientes esta última reacción se mostró más sensible y no se encontró correlación con la primera en la amibiasis intestinal crónica, asintomática y aguda, además se observó fuertemente positiva en el 45.9% de los pacientes del grupo control sin amibas en el momento del estudio.

Es interesante anotar que el grupo control, a pesar de no presentar parásitos en varios exámenes directos y por concentración, dió reacciones serológicas positivas H. I. y P. L., indicándonos una infección amibiana anterior.

RESUMEN

Se estudiaron 135 pacientes, divididos en los siguientes grupos: amibiasis intestinal crónica ó asintomática, amibiasis intestinal aguda, absceso hepático, amibiasis genital y un grupo control sin amibiasis. A todos se les hizo fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, inmunodifusión en agar y prueba del látex.

Los pacientes con amibiasis intestinal presentaron anticuerpos circulantes pero no fué posible separar las formas clínicas entre sí basados en los resultados serológicos. En los casos con amibiasis aguda y crónica se encontraron presentes anticuerpos fijadores de complemento y en la hemaglutinación, pero pocas precipitinas, lo cual indica poca invasión del parásito.

En los pacientes con absceso hepático fué más frecuente el hallazgo de títulos elevados de anticuerpos en todas las reacciones, así como la presencia de bandas de precipitado con la inmunodifusión en agar. La prueba del látex se comportó en general como una reacción muy sensible pero menos específica que las demás y en especial que la inmunodifusión en agar.

SUMMARY

A group of 135 patients that included cases with asymptomatic or chronic intestinal amebiasis, the acute form of the disease, hepatic abscess, genital amebiasis and a control group, were studied for antibodies to *Entamoeba histolytica*, using the complement fixation test, indirect hemagglutination, agar immunodiffusion and latex agglutination test.

The cases with intestinal amebiasis showed circulating antibodies in different titers that did not permit to differentiate the different clinical forms of intestinal amebiasis. In the patients with acute and chronic intestinal amebiasis higher antibody titers were found in the complement fixation and hemagglutination tests than in the precipitin tests, indicating low tissue invasion of the parasites.

The highest titers in all the tests were found in the cases with hepatic abscess. The latex test was in general more sensible but less specific than the other tests, especially the immunodiffusion test.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dopter, M. C.: Sensibilisatrice spécifique dysentérique dans le sérum des animaux et des malades. Ann. Int. Pasteur 19: 753, 1905.
- 2.- Craig, C. F.: Observation upon the hemolytic, cytolytic and complement binding properties of extracts of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. 7: 225, 1927.
- 3.- Craig, C. F.: Complement fixation in the diagnosis of infection with *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. 8: 29, 1928.
- 4.- Menendez, P. E.: Serological relationships of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Hyg. 15: 785, 1932.
- 5.- Heathman, L.: Studies of antigenic properties of some free living and pathogenic amebas. Am. J. Hyg. 16: 97, 1932.
- 6.- Rees, C. W., Bozicevich, S., Reardon, L. V. and Jones, F.: A preliminary complement fixation test for amoebiasis with antigens prepared from *E. histolytica* grown with a single species of bacteria. Am. J. Trop. Med. 22: 501, 1942.
- 7.- Diamond, L. S.: Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science 134: 336-337, 1961.
- 8.- Kessel, J. F., Lewis, W. P., Molina-Pasquel, C. and Turner, J. A. Indirect hemagglutination and complement fixation tests in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 540-550, 1965.

- 9.- Powell, S. J., Maddison, S. E., Wilmot, A. J. and Elsdon-Dew, R.: Amoebic gel diffusion precipitin test. *Am. J. Med. Hyg.* 17: 840, 1968.
- 10.- Ritchie, L. S., Pan C. and Hunter, G. W.: A comparison of the zinc sulfate and the MGL (Formalin-ether) technics. *J. Parasit.* 38: (Suppl). 6, 1952.
- 11.- U. S. Department of Health, Education, and Welfare. Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. 1965 (U. S. Public Health Service Publication 1228).
- 12.- Morris, M. N., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R.: Latex Agglutination Test for Invasive Amoebiasis. *Lancet* 1: 1362-1363, 1970.
- 13.- Morris, M. N., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R.: A rapid latex agglutination test for invasive amoebiasis. *S. African Med. J.* 44: 594-595, 1970.
- 14.- Thompson, P. E., Graedel, S. K., Schneider, C. R., Stucki, W. P. and Gordon, R. M.: Preparation and Evaluation of Standardized Amoeba Antigen from Axenic Cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39: 349-365, 1968.
- 15.- Krupp, I. M. and Powell, S. J.: Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 414-420, 1971.
- 16.- Juniper, K., Worrell, C. L., Minshew, M. C, Roth, L. S., Cypert, H. and Lloyd, R. E.: Serologic Diagnosis of Amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 157-168, 1972.
- 17.- Kotcher, E., Miranda, M. and García de Salgado, V.: Correlation of Clinical, Parasitological and Serological data for individual infected with *Entamoeba histolytica*. *Gastroenterology* 58: 388-391, 1970.
- 18.- Molina, C., Diaz, A., Rosas, M. y Hernández, J.: Estudio de las reacciones de hemoaglutinación y fijación del complemento en el suero de enfermos de amebiasis. *Rev. Invest. Salud Publ. (Mex).* 28: 313-341, 1968.
- 19.- Ruiloba, J. y Zayala, B.: Reacciones serológicas en el diagnóstico de la amebiasis. *Gaceta Med. México* 103: 321-328, 1972.
- 20.- Beaver, P. C., Jung, R. C., Sherman, H. J., Read, T. R. and Robinson, T. A.: Experimental *Entamoeba histolytica* infections in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5: 1000-1009, 1956.
- 21.- Amoebiasis: Report of a W. H. O. expert committee: W. H. O. Technical Report Series 421: 1-52, 1969.
- 22.- Neal, R. A., Robinson, G. L. Lewis, W. P. and Kessel, J. F.: Comparison of clinical observations on patients infected with *Entamoeba histolytica*, with serological titres sera and virulence of their amoebae to rats. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62: 69-75, 1968.
- 23.- Maddison, S. E.: Characterization of *Entamoeba histolytica* antigen-antibody reaction by gel diffusion. *Exper. Parasit.* 16: 224-235, 1965.
- 24.- Maddison, S. E., Powell, S. J. and Elsdon-Dew, R.: Application of serology, to the epidemiology of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 554-557, 1965.
- 25.- Powell, S. J., Maddison, S. E., Wilmot, A. F. and Elsdon-Dew, R.: Amoebic gel-diffusion precipitin test. Clinical evaluation in amoebic liver abscess. *Lancet* 2: 602-603, 1965.
- 26.- Powell, S. J., Hodgson, R. G., Maddison, S. E. and Elsdon-Dew, R.: Amoebic gel-diffusion precipitin-test. Clinical evaluation in acute amoebic dysentery. *Lancet* 1: 566-567, 1966.
- 27.- Stam, W. P., Ashley, M. J. and Parelkar, S. N.: Evaluation of a latex agglutination test for amoebiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 211-213, 1973.