

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



"Comparación del método convencional (observación microscópica en fresco), usado en laboratorios de hospitales nacionales de Guatemala, con la tinción tricrómica de Wheatley en el diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar*"

INGRID ROSIBEL LÓPEZ VALENZUELA

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, ENERO 2008

## INDICE

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	5
A. Historia de la amebosis	5
B. Fases de desarrollo de <i>E. histolytica</i>	6
C. <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	8
D. Ciclo vital	9
E. Epidemiología	11
F. Virulencia de <i>E. histolytica</i>	11
G. Localización en el hospedero	13
H. Transmisión	13
I. Patogénesis y patología	14
J. Sintomatología	17
K. Complicaciones	18
L. Diagnóstico	18
M. Tinción tricrómica	20
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS	24
VI. HIPÓTESIS	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	26
A. Universo	26
B. Muestra	26
C. Recursos	26
D. Materiales	27
E. Métodos	28
F. Metodología	29
G. Procedimiento	30
VIII. RESULTADOS	32

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
X. CONCLUSIONES	38
XI. RECOMENDACIONES	39
XII. REFERENCIAS	40
XIII. ANEXOS	42

## I. RESUMEN

En el presente estudio se analizaron 169 muestras fecales para diagnóstico de amebosis por observación en fresco, provenientes de hospitales nacionales de Guatemala y así comparar los resultados reportados con la coloración tricrómica de Wheatley.

Se establecieron criterios de recolección para las muestras fecales, los cuales incluyeron muestras con diagnóstico positivo para *E. histolytica/dispar*, muestras con formas sospechosas que fueron dudosas al evaluarlas microscópicamente y aquellas muestras con manifestaciones sugestivas de disentería amebiana como diarrea, eritrocitos y moco, aún cuando no se observara el parásito. Las muestras recolectadas se preservaron en una solución de alcohol polivinílico (PVA) y fijador de Schaudinn y junto con su correspondiente ficha epidemiológica fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se hicieron frotos fijos de cada una de las muestras y posteriormente se colorearon con la tinción tricrómica de Wheatley y se observaron microscópicamente.

La finalidad de este estudio fue comparar la concordancia entre método de observación microscópica en fresco utilizado en los laboratorios de hospitales nacionales de Guatemala con la tinción tricrómica de Wheatley, para el diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar*.

De acuerdo a los resultados obtenidos y el análisis estadístico descriptivo propuesto para este estudio, se obtuvo un valor para el índice Kappa de 0.0312 concluyendo que no existe concordancia entre los métodos, y, que el mejor método recomendado en el laboratorio para el diagnóstico de *E. histolytica/dispar* es un frote coloreado con la tinción tricrómica de Wheatley porque realza las características morfológicas de los protozoarios y artefactos evitando falsos diagnósticos.

## II. INTRODUCCIÓN

*Entamoeba histolytica* es el agente responsable de la amebosis, una enfermedad que se manifiesta a nivel intestinal y extraintestinal, invasiva y recurrente. En heces y tejidos se puede encontrar en tres estadios: trofozoíto, quiste inactivo y prequiste (1).

La amebosis intestinal produce una colitis con reacción inflamatoria aguda y ulceraciones que pueden profundizarse y extenderse lateralmente bajo la mucosa aparentemente normal, formando las típicas úlceras en cuello de botella, produciendo un cuadro de diarrea mucosanguinolenta o disentería amebiana (1,2).

La infección por *E. histolytica* puede diagnosticarse en el laboratorio por la detección de organismos en preparaciones fecales, frotos, biopsias de tejidos o muestras de aspirado hepático y pruebas serológicas. La detección del organismo depende de una apropiada recolección, procesamiento y evaluación de la muestra por personal entrenado. La evaluación de tres muestras fecales seriadas, utilizando técnicas de concentración y coloraciones permanentes, es el método estándar recomendado para la detección del parásito (3).

En Guatemala, el diagnóstico de amebosis intestinal depende de la identificación microscópica del parásito en preparaciones con solución salina y lugol, técnica que es poco sensible (20%-30%), cuando el examen es realizado por personal entrenado inadecuadamente, lo cual puede conducir a resultados falsos positivos por confusión con leucocitos u otras células o parásitos y en otros casos se puede pasar por alto una verdadera infección (1,4).

Los frotos fecales teñidos proporcionan un método satisfactorio para mantener una evidencia positiva de los protozoos intestinales identificados en el laboratorio (5). La tinción tricrómica es un procedimiento rápido que da buenos resultados para propósitos de rutina, ya que es un método simple de gran utilidad para la definición de las estructuras citoplásmicas y detalles morfológicos internos del núcleo, por lo que permite diferenciar las amebas patógenas y no patógenas de glóbulos blancos y otros artefactos presentes en la muestra. La tinción tricrómica se ha reconocido como una herramienta diagnóstica sensible para la detección de parásitos intestinales (6), por lo que en este estudio se hizo una comparación entre los resultados en observación en fresco reportados en hospitales nacionales de Guatemala con los resultados de frotos de las mismas muestras coloreados con la tinción tricrómica de Wheatley para establecer si hay concordancia entre ambos resultados.

### III. ANTECEDENTES

#### A. HISTORIA DE LA AMEBOSIS

*Entamoeba histolytica* es un parásito intestinal protozoo que pertenece al phylum de los sarcodinos y es una de las 7 especies de *Entamoeba* capaces de infectar al humano. Este parásito, es el organismo responsable de la amebosis; las otras amebas (*Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba dispar*, *Iodamoeba butschlii*, *Endolimax nana* y *Entamoeba polecki*) no son causantes de enfermedad humana. La amebosis es una de las grandes enfermedades parasitarias del ser humano, afecta predominantemente a individuos de bajo nivel socioeconómico en países en desarrollo (1).

Fue primeramente descrita en 1875 por Lösch, quien la llamó *Amoeba coli* (1), cuando la encontró en las heces de un paciente ruso de 24 años con disentería recurrente (2). Lösch observó una gran cantidad de amebas activamente móviles en las heces de este paciente, las cuales contenían eritrocitos ingeridos. El núcleo de estos organismos era pálido, el protoplasma granular y el nucleolo en posición central, lo cual es característico de *E. histolytica* (3), además produjo experimentalmente las lesiones intestinales en un perro; sin embargo, la relación entre el parásito y la disentería solo quedó demostrada en las investigaciones de Kartulis en 1867 (2).

En 1901, Councilman y Lafleur publicaron un estudio de la anatomía patológica de disentería amebiana y absceso hepático. Schaudinn diferenció *E. histolytica* de *E. coli* en 1903. Diez años más tarde Walter y Sellards dejaron claramente establecido el poder patógeno de *E. histolytica*, administrando quistes de la ameba a voluntarios, poniendo así la base del concepto actual de la relación hospedero-parásito en cuanto a la infección clínica (4).

En América no había publicaciones sobre amebosis, hasta 1890, cuando Osler reportó un caso en el que un paciente que había vivido en Panamá por seis años presentaba disentería crónica. Además, el paciente presentaba manifestaciones clínicas compatibles con absceso hepático. Dos de estos de tamaño grande fueron drenados y Osler examinó el material obtenido observando gran cantidad de amebas que indudablemente eran *E. histolytica* (2).

En Guatemala se han hecho pocos estudios sobre amebosis intestinal, reportándose únicamente algunos trabajos de tesis de la Universidad de San Carlos, que se remontan desde 1909 a la fecha (4). El INCAP realizó algunas evaluaciones en 1965 de donde se reportó que la amebosis

es endémica en la ciudad capital, con un índice de prevalencia del 10% para la capital y del 23% en el área rural (4).

## B. FASES DE DESARROLLO DE *E. histolytica*

En las heces se puede encontrar *E. histolytica* bajo la forma de trofozoíto, prequiste y quiste. A pesar de que para establecerse en el tubo digestivo, *E. histolytica* tiene como forma infectante habitual al quiste tetranucleado, en las infecciones extraintestinales, ya sea por autoinfección o heteroinfección, la forma que se establece y produce daño es el trofozoíto, que mide de 10 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un núcleo que presenta endosoma central y cromatina distribuida regularmente en la membrana nuclear (3).

### a. Trofozoíto

Es un anaerobio facultativo, muy activo y pleomórfico, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios, se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (5,6). El trofozoíto de *E. histolytica* es uninucleado, y posee una membrana celular que está rodeada por una capa de glucocálix (2), el ectoplasma es hialino, ancho, transparente y claramente separado del endoplasma, representa más o menos la tercera parte del parásito y emite un pseudópodo delgado parecido a un dedo (7). El endoplasma de gránulos finos, generalmente contiene bacterias y/o glóbulos rojos en varias etapas de desintegración. El núcleo es excéntrico y puede a veces reconocerse en la ameba como un anillo granuloso y fino (1).

La tinción con hematoxilina muestra una membrana nuclear muy clara, cuya superficie está cubierta de gránulos de cromatina uniformes y pequeños. El cariosoma pequeño toma bien los colorantes y se encuentra en el centro del núcleo. Los trofozoítos poseen movimiento unidireccional y rápido, al ser observados en preparaciones en fresco de heces líquidas. En preparaciones en fresco, los trofozoítos tienen pseudópodos hialinos en forma de dedo, el núcleo es esférico y comprende una quinta o sexta parte del trofozoíto y es difícil de ver en preparaciones en fresco. En preparaciones coloreadas, el tamaño del parásito puede reducirse de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  por el encogimiento que provocan los reactivos para la coloración (1).

El trofozoíto vive en la pared y en la luz del colon, especialmente el ciego (71%) y el recto sigmoide (29%). Se multiplica por fisión binaria y la división del núcleo corresponde a una mitosis modificada. También puede haber reproducción por formación de quiste, la ameba metaquística, la cual, al salir del quiste, produce ocho amébulas. Requiere de un pH bajo (6.0 -6.5), la presencia de bacterias y un medio complejo para crecer. Los trofozoítos en heces sobreviven de 2 a 5 horas a una temperatura de 37°C y pueden sobrevivir hasta 96 horas a 5°C (2,3).

#### b. Prequiste

En esta fase, el trofozoíto llega a tomar aproximadamente el mismo tamaño que el quiste. El citoplasma elimina las inclusiones de alimento, y en algunas ocasiones, los cuerpos cromatoideos están presentes. El prequiste presenta una cubierta blanda y un núcleo agrandado que contiene un cariosoma más o menos central (1,3).

#### c. Metaquiste

Durante el proceso de exquistación, la ameba enquistada que contiene cuatro núcleos se vuelve muy activa y se separa de la pared quística. Durante esta separación, los núcleos se agrupan y la ameba cuatrinucleada escapa de la pared quística por medio de un poro diminuto (3).

#### d. Trofozoíto metaquístico

Fuera del quiste, los núcleos de la ameba cuatrinucleada comienzan a separarse del citoplasma que los rodea y sufren una división para formar ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados. Los trofozoítos que resultan de esta división son siempre más pequeños que los que se observan en el intestino de un humano infectado. Los trofozoítos metaquísticos continúan alimentándose y creciendo para finalmente alcanzar el tamaño normal asociado con el trofozoíto (1,3).

#### e. Quiste

Los quistes son una forma de resistencia de *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del hospedero por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la ameba se da cuando las condiciones ambientales son desfavorables a los trofozoítos. Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente, y núcleos en número de uno a cuatro (6,8). El citoplasma de los quistes jóvenes contiene vacuolas con glucógeno y cuerpos cromatoides, que son alargados oscuros, muy refringentes, de extremos redondeados. Estos cuerpos cromatoides, que al parecer contienen fosfatos y ácido desoxirribonucleico, tienden a desaparecer cuando el quiste madura. Ambos tipos de inclusiones citoplásmicas parecen representar reservas de alimentos (3,9).

El parásito habita en el colon de los humanos, primates, perros, gatos, cerdos y peces. Los individuos infectados pueden expulsar hasta 45 millones de quistes por día, los cuales pueden sobrevivir por varias semanas en un medio húmedo a temperatura ambiente (3).

*E. histolytica* se desarrolla mejor en un ambiente anaeróbico y con tensión de oxígeno reducida. Sintetiza compuestos protoplásmicos para producir sustancias nutritivas mediante varias enzimas, como la fosfatasa alcalina. Este parásito puede utilizar la dextrosa extracelular. En los cultivos ha podido demostrarse cierta actividad aminolítica (10). Los productos de desecho en forma soluble o en gránulos, se eliminan por vacuolas excretorias superficiales; las partículas no digeridas se excretan por protuberancias del ectoplasma (4).

La ameba absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos por sus enzimas citolíticas e ingiere glóbulos rojos, hemoglobina, sustancias parcialmente sintetizadas por el hospedero y fragmentos de tejido, todo ello por inclusión de un pseudópodo. Puede ingerir bacterias y fragmentos de materias fecales del intestino. Su desarrollo óptimo tiene lugar a 37°C a pH 7, en condiciones anaeróbicas (10).

#### C. *Entamoeba histolytica/dispar*

Durante mucho tiempo se ha sabido que muchas personas infectadas con *E. histolytica* nunca desarrollan síntomas y la infección desaparece espontáneamente, lo cual ha llevado a indicar que se trata de un parásito de virulencia variable. Emile Brumpt, en 1925, sugirió que existían dos especies, una capaz de invadir la mucosa intestinal y producir diarreas sanguinolentas, *Entamoeba*

*histolytica*; y otra que no fagocita los glóbulos rojos ni invade los tejidos (no patógena), a la que llamó *Entamoeba dispar*; esta hipótesis fue rechazada por otros científicos de la época. Sin embargo, los datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos recolectados a partir de 1970, apoyan la hipótesis de Brumpt (1). En la reunión de expertos de amebosis (WHO/PAHO) durante el XIII seminario en amebosis que tuvo lugar en enero de 1997 en la ciudad de México, se examinó la evidencia de la existencia de dos especies dentro de lo que hasta ahora se ha llamado *E. histolytica* y entre los resultados se reconoció la existencia de *E. histolytica* y *E. dispar*; la diferenciación entre estas dos especies solamente puede hacerse por métodos enzimáticos, moleculares y serológicos (1). *E. histolytica* debe ser utilizado en el futuro solamente en referencia a la especie capaz de causar enfermedad invasiva. Cuando la diferenciación entre las dos especies no sea posible debido a razones técnicas, la infección debe ser reportada como *Entamoeba histolytica/dispar* (1,4).

#### D. CICLO VITAL

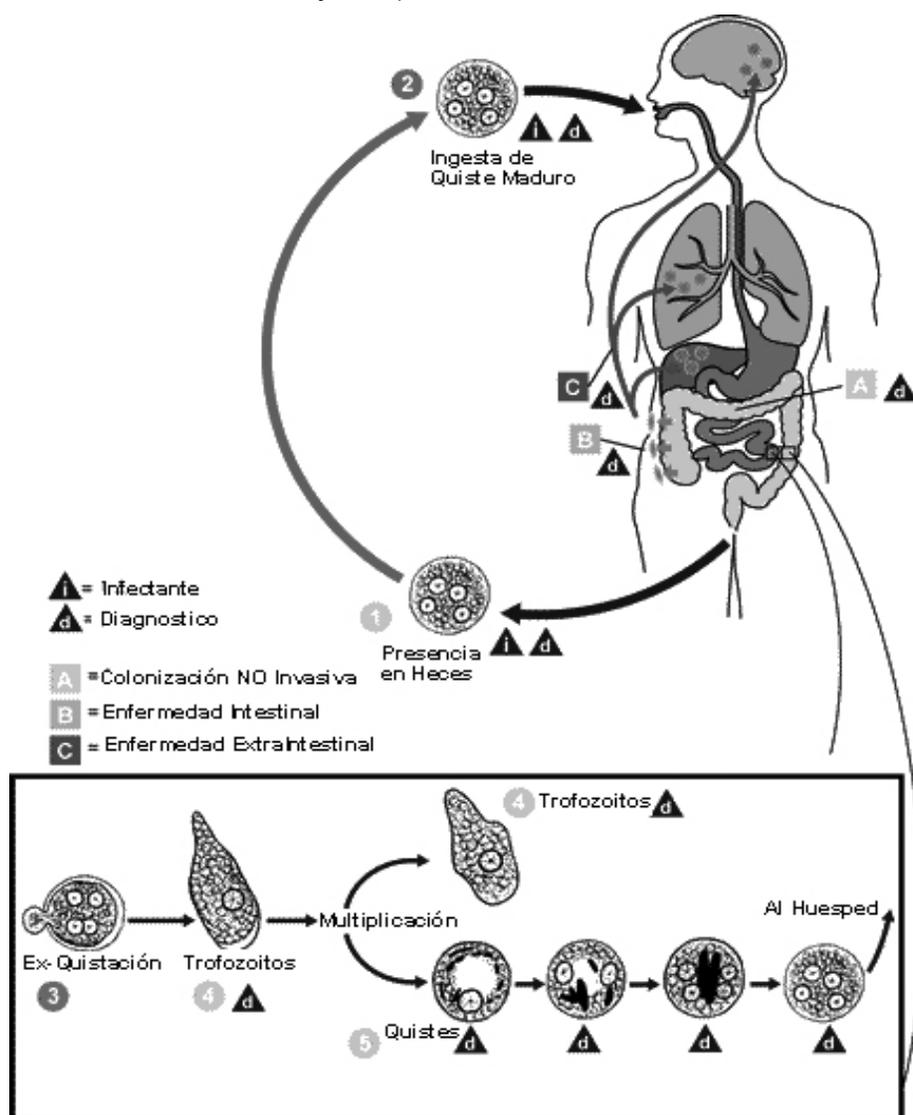
El ciclo de vida de *E. histolytica/dispar* fue descrito extensamente por Dobell e incluye la descripción de los diferentes estadios del parásito (3).

Los quistes infectivos resistentes que se forman en la luz del intestino grueso son expulsados con las heces y después de cierto tiempo son ingeridos por un nuevo hospedero. La infección se inicia con la ingesta de quistes (los cuales son capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal (11). En el intestino delgado ocurre el desenquistamiento o eclosión, que consiste en la división del quiste cuatrinucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoítos. Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares se reproducen por fisión binaria y algunos se enquistan y son eliminados con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A, infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal), o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones cerebro etc. (C: enfermedad extraintestinal). Se ha establecido que las formas invasivas y no invasivas representan

especies separadas: *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente, que son morfológicamente indistinguibles. La transmisión también puede ocurrir por exposición fecal durante el contacto sexual (en tal caso no solo los quistes sino también los trofozoítos son infectantes) (11).

En la disentería aguda se expulsan pocos quistes o ninguno; pero son muy frecuentes en infecciones crónicas. El hombre no es el único, pero sí el principal reservorio de *E. histolytica*, como portador sano o convaleciente, es la principal fuente de excreción de quistes infectantes patógenos. La etapa en la que se puede ser portador varía desde meses hasta dos años (12). En la mayoría de los individuos infectados, *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (10).

Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica/dispar*.



## E. EPIDEMIOLOGIA

Las infecciones por *E. histolytica* ocurren en todo el mundo pero presentan mayor prevalencia en los trópicos. Se ha estimado que aproximadamente, 480 millones de personas, o 12% de la población mundial está infectada y que anualmente la mortalidad es hasta de 110,000 casos. La prevalencia de la infección difiere de un área a otra, como también lo hace la severidad de la enfermedad de un paciente a otro. Las diferencias en la prevalencia dependen muchas veces de los métodos de detección que se utilizan y el número de exámenes fecales que se realizan (1,3).

El ser humano es el mayor reservorio de la infección, la ingestión de comida y agua contaminada con quistes de *E. histolytica* provenientes de heces humanas y contacto oral-fecal directo son las razones más comunes de infección, especialmente en los países tercermundistas, donde la mayoría del agua que se utiliza para beber no recibe el tratamiento adecuado (3).

Los grupos reconocidos con alto riesgo de adquirir la infección incluyen viajeros, inmigrantes, individuos inmunocomprometidos, individuos en instituciones mentales, y homosexuales masculinos sexualmente activos (3).

## F. VIRULENCIA DE *E. histolytica*

La amebosis invasora sintomática se desarrolla en un 10% de los individuos con infección asintomática por *E. histolytica*. Por consiguiente, la enfermedad se desarrollaría en 1 de cada 100 que se infectaran asintomáticamente con *E. histolytica*. Es importante señalar que entre los muchos miles de individuos estudiados hasta la vez no se ha reportado que *E. dispar* cause enfermedad invasora. Además la *E. dispar* no induce la producción de anticuerpos. En cambio, la infección asintomática por *E. histolytica* si causa una respuesta inmune humoral. En áreas de endemidad, la alta prevalencia de individuos que son seropositivos (a menudo el 25% de la población) se debe aparentemente a casos de una remota infección por *E. histolytica*. Esta elevada frecuencia ha confundido el uso de la serología para el diagnóstico de la amebosis invasora en áreas de endemidad (9).

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de *E. histolytica* a partir de la aparición de los primeros medios sintéticos para su cultivo y su posterior perfeccionamiento. Sin

embargo, el papel de la respuesta inmune en el control de la enfermedad no está bien establecido, menos aún el singular comportamiento del parásito observado por décadas, que con frecuencia actúa como comensal y más raramente como invasor (3,9).

La explicación a esta conducta ha dado origen a una controversia que persiste actualmente, en torno de si existen distintas especies de *Entamoeba* morfológicamente idénticas pero de diferente patogenicidad y/o virulencia o de si es una sola especie que expresa estas características sólo bajo ciertas circunstancias del medio o del hospedero. Al parecer la balanza se inclina por la postura que sostiene que existen distintas especies de *Entamoeba* que son morfológicamente idénticas. *Entamoeba dispar*, la especie más común se asocia principalmente con el estado de portador asintomático. La especie patogénica, referida como *E. histolytica* tiene la capacidad de invadir los tejidos y causar enfermedad sintomática. La existencia de especies distintas fue inicialmente sugerida por los estudios de zimodemos. Así, distintos zimodemos se asociaron con la enfermedad sintomática invasora (*E. histolytica*) o con el estado de portador asintomático (*E. dispar* o *E. histolytica*). La investigación utilizando sondas de RNA o DNA indicaron diferencias genéticas entre *E. dispar* y *E. histolytica*. Utilizando la técnica de PCR se han encontrado diferencias en fragmentos genómicos de DNA entre ambas especies. En muestras clínicas se han podido distinguir cepas patógenas de las no patógenas empleando cDNA y lo mismo puede decirse cuando se han empleado sondas de rRNA. En lo que se refiere a diferencias antigénicas entre *E. dispar* y *E. histolytica* se han encontrado diferentes epitopos en la subunidad pesada de 170 kDa de la lecitina inhibible por galactosa en *E. histolytica*, pero no en *E. dispar*. Otra diferencia es la presencia de eritrocitos ingeridos por *E. histolytica* lo que no sucede con *E. dispar* (9).

La confirmación de estas dos especies diferenciadas de *Entamoeba* es quizá el más reciente e importante logro en el campo de la investigación en amebosis. Además, han sido identificadas proteínas asociadas con su virulencia, incluida una lectina que media en la adherencia a las células epiteliales, un péptido que forma poros que destruye las células del hospedero, y de la secreción de proteasa que degrada los tejidos del hospedero. La virulencia de estas proteínas, así como otros antígenos únicos presentes en la superficie de los parásitos, son blancos potenciales para las vacunas antiamebianas. Los estudios bioquímicos han identificado a las enzimas de fermentación similares a las bacterias, las cuales se constituyen en el objetivo principal del metronidazol, el

medicamento antiamebiano más potente en los tejidos y han sugerido nuevas metas para los medicamentos antiamebianos (13).

Es importante diferenciar la *E. histolytica* de otros protozoos que habitan en el colon humano sin producir enfermedad. Las amebas que más frecuentemente se confunden con *E. histolytica* son *E. hartmanni* y *E. coli*. *E. hartmanni* es más pequeña que la *E. histolytica*, sus trofozoítos miden menos de 12  $\mu\text{m}$  y los quistes menos de 10  $\mu\text{m}$ . *E. coli* se diferencia de *E. histolytica* en que sus movimientos son más lentos, no tiene eritrocitos ingeridos en su citoplasma y los quistes son más grandes y tienen de 5 a 8 nucleolos (2).

## G. LOCALIZACIÓN EN EL HOSPEDERO

La amebosis extraintestinal producida por *E. histolytica* se puede observar como amebosis cutánea de localización perianal o perineal, abdominal y, aunque raro, en la parrilla costal. La amebosis hepática y las diferentes localizaciones consecutivas a la ruptura del llamado absceso hepático amebiano pueden ser pulmonar, renal o cerebral, entre otras (9).

## H. TRANSMISIÓN

La forma infectiva de *E. histolytica* es el quiste maduro cuatrinucleado. A diferencia de los trofozoítos, los quistes pueden permanecer viables por períodos prolongados de tiempo bajo diferentes condiciones ambientales. Son resistentes a los jugos gástricos y a las enzimas digestivas. Los quistes de esta ameba conservan su capacidad infectiva en heces, en agua y en el suelo. Son resistentes al cloro en cantidades que se utilizan normalmente para purificar agua y así, este procedimiento no puede prevenir las epidemias causadas por la contaminación fecal del agua. Por su alta resistencia, los quistes pueden permanecer viables en el suelo por ocho días a una temperatura de 28 a 34°C, cuarenta días de 2 a 6°C, y sesenta días a 0°C. Los quistes pueden destruirse cuando se exponen a yodo (200 ppm), ácido acético en concentraciones del 5 al 10%, y temperaturas mayores de 68°C, y pueden ser removidos por filtración con arena (13).

El riesgo de infección está relacionado con una deficiente educación en cuanto a higiene y sanidad ambiental, especialmente en la distribución del agua, eliminación de desechos fecales,

seguridad alimentaria, hacinamiento y hábitos de higiene. Se ha demostrado que la frecuencia de portadores es mayor en áreas donde hay casas con suelo de tierra, sin agua purificada y sistemas de drenajes. La contaminación de los sistemas de distribución de agua potable con heces que contienen quistes viables pueden causar serios brotes epidémicos, que muchas veces no se registran en la literatura, especialmente en países en vías de desarrollo, donde los sistemas de distribución de agua son deficientes, y donde el agua para el consumo humano es obtenida de ríos, pozos, y otras fuentes. El agua de estas fuentes así como aquellas que se utilizan para el riego de cultivos, están frecuentemente contaminadas con material fecal. La contaminación de alimentos por este y otros mecanismos como la falta de higiene en el manejo de alimentos y el uso de heces como fertilizante, son sin duda, los principales mecanismos de transmisión de *Entamoeba histolytica* en países en desarrollo (3,13).

No todos los individuos que ingieren los quistes se convierten en portadores. Esta variación puede estar relacionada con el tamaño del inóculo, características de la cepa del parásito, la susceptibilidad del individuo y los factores ambientales (13).

## I. PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA

*E. histolytica* es única entre las amebas intestinales que parasitan al humano porque es capaz de invadir tejidos. Después de que el hospedero ingiere los quistes, los trofozoítos metaquísticos escapan del metaquiste en el tracto gastrointestinal y colonizan el ciego. Hasta el momento, los mecanismos de colonización y patogenicidad no son bien comprendidos. Se ha observado que la microbiota juega un papel directo en la virulencia de *E. histolytica* y su habilidad para colonizar el hospedero. Los síndromes clínicos asociados con la amebosis varían con el hospedero y el organismo; estos síndromes pueden manifestarse desde una infección asintomática hasta una enfermedad diseminada fatal. Cuando la infección se disemina hacia sitios extraintestinales, más frecuentemente se localiza en el lóbulo derecho del hígado (1,3).

Investigaciones sobre los mecanismos de patogenicidad sugieren que la patogénesis depende de la exportación de toxinas solubles, el otro considera que es dependiente del contacto celular. Se ha postulado que la ameba puede exportar proteínas formadoras de poros que forman poros acuosos en la superficie celular de las células blanco y también producen productos citotóxicos que son liberados del organismo y causan el efecto citotóxico inicial en la célula

hospedera. *E. histolytica* contiene además numerosas enzimas proteolíticas incluyendo la catepsina B, una proteinasa ácida, colagenasa y protinasa neural. Las proteinasas parecen estar implicadas en la disolución de la matriz extracelular que fija las células. Los leucocitos polimorfonucleares que constituyen la respuesta inicial del hospedero a los trofozoítos de *E. histolytica*, son invariablemente destruidos por esta y sus productos de la lisis aumentan el daño a los tejidos (3,5).

La adherencia de la ameba a la mucosa intestinal parece ser un mecanismo importante en la patogénesis de la enfermedad. Esta adherencia precede la invasión del tejido intestinal. Se ha demostrado *in vivo* que las amebas se encuentran adheridas a células inflamatorias del hospedero en la invasión del colon y en abscesos hepáticos amebianos. También se ha demostrado que la lisis de las células blanco se debe a este factor de adherencia. De las adhesinas descritas que permiten la adherencia de la ameba a las células blanco, hay una que es inhibida por la N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) o residuos de galactosa; Leitch postuló que la ameba es capaz de invadir el epitelio intestinal en áreas donde la capa mucosa es delgada y hay menos GalNAc para proteger al hospedero (3). El Gal NAc funciona como receptor de una adhesina en la superficie de la ameba. Esta adhesina también es responsable de la adherencia de la ameba a bacterias, eritrocitos y leucocitos humanos, mucosa y submucosa del colon humano, manifestando capacidad para lisar estas células (2).

Otro factor que se relaciona con la invasión del tejido por la ameba es la nutrición del hospedero. Se ha observado que las personas que llevan una dieta baja en proteínas son más susceptibles a sufrir una infección amebiana, y las que ya están infectadas pueden eliminar el parásito si son alimentadas con dietas altas en proteína. La desnutrición se ha asociado más a la enfermedad amebiana invasiva en el humano (2).

#### a. Lesión intestinal

La invasión de la mucosa colónica comienza en el epitelio interglandular. Inicialmente la ulceración es superficial y el infiltrado celular es mínimo. Puede haber hiperplasia reactiva en los agregados linfoides cercanos. Las ulceraciones pueden profundizarse y extenderse lateralmente bajo la mucosa aparentemente normal, formando las típicas úlceras en cuello de botella (5). Los trofozoítos usualmente se ven en la periferia de las áreas necróticas, ocasionalmente pueden extenderse hasta la capa serosa y producir perforación seguida de peritonitis o absceso hepático

(14). En los casos severos de amebosis intestinal usualmente hay inflamación y las células inflamatorias rodean los parásitos e infiltran todas las estructuras dañadas. En algunos casos una contaminación bacteriana secundaria puede estar relacionada con la inflamación (9). Raramente hay una respuesta inflamatoria que da como resultado tejido de granulación sin fibrosis conocido como ameboma. Ocasionalmente, un ameboma puede llenar el lumen y producir obstrucción (2).

#### b. Absceso hepático

La infección hepática resulta de la migración de trofozoítos a través de la vena porta. En el absceso el parénquima hepático está completamente sustituido por restos necróticos con escasos trofozoítos y células inflamatorias. La lisis de los neutrófilos por las amebas libera productos tóxicos no-oxidativos que contribuyen a la destrucción del tejido. Los trofozoítos sólo se encuentran en la pared del absceso. Los trofozoítos son frecuentemente detectados en el lóbulo derecho del hígado, se diagnostica principalmente en adultos masculinos en edades comprendidas entre los 20 y 60 años. El color del fluido puede variar de amarillento hasta café oscuro, con apariencia de pasta de anchoas. Generalmente, el absceso es estéril. El examen microscópico del fluido del absceso revela debris granular de eosinófilos con escasas o sin células (3).

La amebosis es una enfermedad que afecta a ciertos grupos de individuos, tales como pacientes de instituciones mentales, homosexuales, viajeros, inmigrantes, personas de clase socioeconómica baja e inmunocomprometidos. Las condiciones que permiten que se dé la enfermedad invasiva y que se resuelva, son multifactoriales, y probablemente se requiera de un balance entre los mecanismos patogénicos del parásito y los mecanismos de defensa del hospedero (13).

Los mecanismos de defensa del organismo desencadenados por *E. histolytica* aún no han sido establecidos. Se ha observado que este parásito provoca una respuesta compleja de tipo celular y humoral, además de muy poca inflamación local. La respuesta humoral se desarrolla en la enfermedad invasiva, pero no se ha correlacionado con protección permanente contra la enfermedad. Las células polimorfonucleares no han sido capaces de destruir a las cepas de amebas virulentas *in vitro*, lo cual puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad. También se reportan estudios *in vitro* que muestran macrófagos y linfocitos T citotóxicos capaces de matar amebas virulentas (13).

Se ha observado que los macrófagos juegan un papel importante en presentar la proteína amebiana (antígeno) a los linfocitos T para que sean sensibilizados. Se han reportado algunos estudios en los que se ha hecho biopsia rectal a pacientes con amebosis para determinar si hay invasión del tejido, pero raramente se describe el tipo de infiltrado que se encuentra. Pittman y colaboradores, reportaron en un estudio de microscopía electrónica en amebosis, el hallazgo de neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas y células epiteliales en la lámina propia y el exudado. Sin embargo, este estudio fue realizado en nueve pacientes, y estos hallazgos fueron interpretados por los investigadores como un tipo de reacción inflamatoria no específica difusa, ya que fueron observados tanto en biopsias en las que había trofozoítos, como en las que no los tenían (2).

## J. SINTOMATOLOGÍA

La infección intestinal por *E. histolytica* causa un espectro amplio de condiciones. Las principales formas son: Portadores asintomáticos, colitis amebiana aguda, colitis fulminante y ameboma (5).

### a. Portador asintomático

Conforme a la evidencia actual, todas las infecciones por *E. dispar* son asintomáticas. Por el contrario, en las infecciones por *E. histolytica* una proporción variable son portadores asintomáticos. Estudios en México y otras regiones han mostrado que un mayor porcentaje de infecciones por esta ameba son asintomáticas. Es particularmente importante identificar y tratar a estos pacientes ya que son una fuente potencial de transmisión de la enfermedad (5).

### b. Colitis aguda

Los pacientes con colitis amebiana aguda usualmente se presentan con una historia de 1 a 2 semanas de dolor abdominal, tenesmo y frecuentes evacuaciones diarreicas con moco y sangre. Pueden agregarse otros síntomas como dolor lumbar y flatulencia. Una minoría de los pacientes presentan fiebre, lo que contrasta con la disentería bacilar, y en algunos la diarrea puede causarles deshidratación. En la mayoría de los casos hay sensibilidad abdominal a la palpación. En la

endoscopia se observa la apariencia característica de pequeñas úlceras hemorrágicas con una mucosa normal entre ellas (12,13).

#### c. Colitis fulminante

Es una complicación inusual de la disentería amebiana que tiene un pronóstico grave, con una mortalidad mayor de 50%. Clínicamente los pacientes se presentan con una diarrea sanguinolenta muy severa y fiebre, seguida de una instalación rápida de dolor abdominal difuso. El progreso puede ser tan rápido que la rigidez abdominal se ha presentado sólo en un 25% de pacientes con perforación intestinal detectada mediante cirugía. Los niños de menor edad tienen más riesgo de presentar colitis fulminante. El desarrollo clínico de la colitis fulminante está asociado con la extensión de las úlceras hasta la capa serosa (12,13).

#### d. Ameboma

Es una presentación inusual de la amebosis intestinal que ocurre en menos del 1% de los pacientes con enfermedad invasora intestinal. La mayoría de los pacientes presentan una masa intestinal que puede presentar dolor a la palpación. En la radiografía el ameboma se confunde con un carcinoma de colon. Una prueba serológica o una biopsia evitarían una cirugía innecesaria (12,13).

### K. COMPLICACIONES

La complicación más común de la colitis amebiana es la peritonitis. Los pacientes usualmente desarrollan una filtración lenta de contenido intestinal con el subsiguiente retardo en el inicio de los signos de peritonitis, pero en la colitis fulminante puede ocurrir una perforación rápida. Menos frecuentemente se presentan las hemorragias repentinas de las estructuras rectales, o del sigmoide. La amebosis cutánea puede ocurrir como una extensión directa de la infección intestinal. Esta se presenta como úlceras muy dolorosas, que se pueden confundir con carcinomas (5).

### L. DIAGNÓSTICO

La infección por *E. histolytica* puede diagnosticarse en el laboratorio por la detección de organismos en preparaciones fecales, frotis, biopsias de tejidos o muestras de aspirado hepático y

pruebas serológicas. La detección del organismo depende de una apropiada recolección, procesamiento y evaluación de la muestra por personal entrenado. La evaluación de 3 muestras fecales seriadas, utilizando técnicas de concentración y coloraciones permanentes, es el método estándar recomendado para la detección del parásito. El examen realizado por personal entrenado inadecuadamente para el diagnóstico en el laboratorio, puede conducir a resultados falsos positivos por confusión con leucocitos u otras células o en otros casos se puede pasar por alto una verdadera infección. Aunque las preparaciones en fresco o las muestras frescas pueden examinarse en busca de trofozoítos móviles que contengan eritrocitos, la mayoría de los pacientes no portan trofozoítos con eritrocitos. Las muestras frescas de heces, idealmente deben examinarse en los primeros 30 minutos después de emitida la muestra, no 30 minutos después de su llegada al laboratorio. Si la muestra no puede examinarse durante el tiempo establecido, debe preservarse en algún fijador apropiado como el alcohol polivinílico (PVA), ya que este puede preservar los protozoarios en su fase de trofozoíto. Aunque alguna literatura aboga por el uso de preparaciones directas en fresco para la identificación de *E. histolytica*, la identificación debe siempre confirmarse utilizando un frote coloreado con una tinción permanente (1,3).

Aún cuando se lleve a cabo una sigmoidoscopia, también debería colectarse un mínimo de tres muestras de heces para ser examinadas. No se debe muestrear menos de seis áreas de la mucosa, el material raspado o aspirado de la superficie de la mucosa puede ser examinado mediante una preparación en fresco con solución salina al 0.85% para detectar movimiento amebiano. El examen microscópico puede resultar complicado, ya que se necesita una baja intensidad de luz y la dificultad en la diferenciación entre las amebas sin teñir y el material celular. En preparaciones en fresco, otros protozoarios como *E. coli* pueden aparentar ser *E. histolytica*. Sólo una evaluación cuidadosa permite distinguir una ameba de otras células del hospedero, como leucocitos polimorfonucleares con quistes de *E. histolytica* y los macrófagos, que pueden ser confundidos con trofozoítos de este mismo parásito. Con el material obtenido de la mucosa intestinal, puede también hacerse un frote e inmediatamente ser sumergido en fijador de Schaudinn. Un método alternativo para preparar un frote fijo de la muestra consiste en agregar de 2 a 3 gotas de PVA directamente sobre el material de la mucosa en la lámina, mezclarlo y permitir que seque al aire. Estos dos métodos proveen un montaje permanente que puede ser teñido con la tinción tricrómica (3).

En muestras histológicas, es probable que en algunos organismos no sea posible observar todos los detalles del núcleo y sea necesario examinar secciones secuenciadas para poder identificar dicho organismo. La ameba debe diferenciarse de las células hospederas normales, como los histiocitos. Los aspirados hepáticos pueden examinarse para buscar al organismo, pero este procedimiento raramente se realiza y cuando se hace, raramente se hace de forma correcta. En estas muestras, las amebas se encuentran esparcidas en el material necrótico del centro del absceso, pero son más abundantes en las paredes marginales. De manera que, se encuentran más comúnmente en las últimas porciones del material aspirado (5).

En la amebosis extraintestinal, los organismos pueden o no encontrarse en las heces; por lo tanto, se hace necesario utilizar alguno de los exámenes serológicos disponibles para el diagnóstico. La serología no debe utilizarse solo para el diagnóstico de la amebosis intestinal, porque los títulos de anticuerpos pueden ser bajos y/o imposibles de interpretar, particularmente con pacientes de un área endémica donde ya exista una alta prevalencia de seropositividad. Los portadores asintomáticos de quistes, normalmente tienen pruebas serológicas negativas, pero existe una buena correlación entre la infección con zimodemos patológicos (12,14).

#### M. TINCIÓN TRICRÓMICA

El diagnóstico de amebosis se hace usualmente por microscopía en muestras de heces concentradas en solución salina sin usar tinción alguna, por lo que las características morfológicas no son identificadas y muchas veces son confundidas con leucocitos o quistes de otros parásitos como *E. coli* o *E. hartmanni* que pudieran estar presentes en la muestra y son erróneamente identificados como *E. histolytica* (15).

La confirmación del organismo, además del examen directo en fresco de la muestra por medio de tinciones permanentes como la tinción hierro-hematoxilina o la tinción tricrómica de Wheatley, es el método estándar recomendado para la identificación del parásito (8). Los frotos fecales teñidos proporcionan un método satisfactorio para mantener una evidencia positiva de los protozoos intestinales identificados en el laboratorio. La tinción tricrómica es un procedimiento rápido que da buenos resultados para propósitos de rutina, ya que es un método simple de gran utilidad para la definición de las estructuras citoplásmicas y detalles morfológicos internos del núcleo,

por lo que permite diferenciar las amebas patógenas y no patógenas de glóbulos blancos y otros artefactos presentes en la muestra (16).

La tinción permanente de frotos fecales mediante la tinción tricrómica ha sido utilizada en el pasado por algunos científicos para la detección de parásitos y se observó que esta técnica es altamente sensible. Esta tinción fue utilizada por primera vez por Pollack y Mars en 1944 para frotos vaginales (17). Gomori, en 1950 reportó que al combinar los ingredientes tricrómicos en una misma solución, se puede obtener una excelente diferenciación policromática en frotos histológicos, y actualmente esta técnica se utiliza para la diferenciación tisular en el campo de la histopatología. Wheatley, en 1951, aplicó esta técnica para demostrar la presencia de quistes y trofozoítos de *E. histolytica* en casos graves de amebosis. Desde estos primeros estudios, el método de la tinción tricrómica se ha reconocido también como una herramienta diagnóstica sensible para la detección de parásitos intestinales, pero desafortunadamente no se le ha dado la debida importancia en varias partes del mundo (18).

Comparaciones hechas entre varios métodos revelan que el examen de muestras fecales mediante tinciones demuestran tener gran sensibilidad ya que detectan de 30% a 50% más infecciones por *E. histolytica* que el examen directo con lugol y solución salina o únicamente solución salina (8).

Estévez (1985), publicó el poco valor diagnóstico de las preparaciones en fresco, en su estudio examinó 2,206 muestras de heces, en las que el 20.6% de las muestras revelaron la presencia de parásitos intestinales por medio de la tinción tricrómica, en comparación con un 3.3% de parásitos encontrados con un examen en fresco. Los parásitos detectados exclusivamente mediante la tinción tricrómica fueron siempre protozoarios que se presentaban en forma de quistes y trofozoítos, lo que indicó que a menudo hay quistes que no se detectan en preparaciones en fresco, probablemente por estar en escasa cantidad y por su pequeño tamaño, reportó también que, tres muestras positivas para *E. histolytica* fueron encontradas únicamente mediante la tinción tricrómica (20).

Levy (1993), en un estudio realizado en cinco laboratorios privados de Guatemala, determinó el sobrediagnóstico de *E. histolytica* utilizando la tinción tricrómica como método de confirmación, dio a conocer que el porcentaje de diagnósticos acertados para *E. histolytica* en los laboratorios participantes fue de 17.5 %, lo cual refleja que sí existe un sobrediagnóstico de infección por este parásito (2).

Rayan (2005), en un estudio donde utilizó la tinción tricrómica para diferenciar *E. histolytica* de otros parásitos en heces, concluyó que existe sobrediagnóstico de amebosis intestinal, donde *E. coli*, *E. hartmanni* y células polimorfonucleares fueron erróneamente diagnosticados como *E. histolytica* (19).

#### IV. JUSTIFICACION

En Guatemala, las enfermedades diarreicas son una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños. Si se sospecha de amebosis, el diagnóstico se hace por microscopía de muestras de heces concentradas en solución salina sin usar tinción alguna, sin embargo, este método tiene desventajas, ya que se requiere una gran habilidad microscópica para identificar correctamente al parásito, por lo que el diagnóstico de rutina para heces es de poca sensibilidad cuando se realiza por personal de laboratorio no entrenado, y en la mayoría de los casos no se hace medición de los quistes y/o trofozoítos por carecer de oculares con micrómetro o por falta de experiencia y tiempo, dando lugar a falsos positivos por confundir leucocitos y otras amebas con *E. histolytica*.

Por lo anterior, se considera importante realizar este estudio utilizando la tinción tricrómica de Wheatley para confirmar los diagnósticos de *Entamoeba histolytica/dispar* reportados en los laboratorios de hospitales nacionales en Guatemala, con el fin de establecer si existe concordancia entre ambos resultados y dar a conocer la importancia de confirmar un resultado observado en fresco con un frote teñido de la misma muestra.

## V. OBJETIVOS

### A. General:

Comparar la concordancia del método convencional (observación microscópica en fresco) con la Tinción Tricrómica de Wheatley en el diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar* en Laboratorios de Hospitales Nacionales de Guatemala.

### B. Específicos:

1. Determinar los artefactos, células y otros parásitos con los que frecuentemente se confunden los quistes de *Entamoeba histolytica/dispar* en los laboratorios de hospitales nacionales de Guatemala.
2. Determinar el porcentaje de falsos positivos reportados para *Entamoeba histolytica/dispar* en laboratorios de hospitales nacionales de Guatemala.
3. Determinar la concordancia entre el método convencional y la tinción tricrómica en el diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar*.

## VI. HIPÓTESIS

El método convencional (observación microscópica en fresco), presenta una buena concordancia con la tinción tricrómica de Wheatley.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

El total de heces diagnosticadas con *Entamoeba histolytica/dispar* recolectadas en 18 hospitales nacionales cuyos laboratorios clínicos están a cargo de los estudiantes de EPS de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### B. Muestra

1. Muestras de heces reportadas con quistes y/o trofozoítos de *E. histolytica/dispar*.
2. Heces que presenten formas sospechosas de *E. histolytica/dispar* que sean dudosas al evaluarlas microscópicamente.
3. Muestras con características de disentería por amebas (presencia de moco y sangre) o cuando haya sospecha clínica de amebosis.

### C. Recursos

#### 1. Humanos

- Tesista: Br. Ingrid Rosibel López Valenzuela
- Asesora: Licda. Beatriz López
- Estudiantes EPS de Química Biológica
- Técnicos de laboratorio de los hospitales que entrarán en el estudio
- Profesionales y personal técnico del Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala.

#### 2. Institucionales

- Hospitales Nacionales
- Área de Coprología de cada Hospital Nacional
- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC)
- Laboratorio de Parasitología, Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala

## D. Materiales

### 1. Equipo

- Centrífuga con rotor para tubos de 10 mL a 16 mL, con cronómetro y que funcione a velocidad entre 1000 y 4000 rpm.
- Microscopio binocular con objetivos de 10X, 40X, 100X y micrómetro.

### 2. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Alcohol polivinílico (PVA)
- Alcohol ácido
- Alcohol-Yodo
- Colorante tricrómico
- Etanol al 70%
- Etanol al 95%
- Fijador de Schaudinn
- Hemo-De
- Lugol
- Permout
- Solución salina

### 3. Cristalería

- Frascos con tapón de rosca para conservación de muestras
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos

### 4. Otros

- Coladores
- Guantes
- Hieleras medianas
- Palillos de madera
- Papel limpia lentes
- Papel Parafilm

- Papel pH
- Pipetas Pasteur
- Toallas de papel
- Tubos cónicos plásticos o de vidrio
- Vasos plásticos

## E. Métodos:

### 1. Diseño de la Investigación:

#### a. Tipo de muestreo:

Muestreo no probabilístico por cuota.

#### b. Número de muestras:

Cálculo de "n":

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó el módulo de cálculo del programa Epidat versión 3.0, utilizando los siguientes datos:

Valor Kappa mínimo esperado para establecer concordancia: 0.75, asumiendo un 50% de positividad en cada método, con una precisión del 10%.

$$\text{Kappa} = 0.75$$

$$\text{Error} = 0.10$$

$$n = 169$$

Como mínimo son 169 muestras para establecer concordancia.

#### c. Variable de interés:

Identificación de *Entamoeba histolytica/dispar*.

d. Análisis de Resultados: Cálculo del índice Kappa con un intervalo de confianza del 95%. Se utilizaron los criterios de Fleiss para su interpretación; descriptivamente, mediante tablas se compararon los resultados (verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos).

### Interpretación del índice Kappa (k) según Fleiss.

VALOR DE (k)	FUERZA DE LA CONCORDANCIA
< 0.20	No existe
0.21 - 0.40	Débil
0.41 - 0.60	Moderada
0.61 - 0.80	Buena
0.81 - 1.00	Muy buena

### F. Metodología

Las muestras con diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar* fueron recolectadas por los estudiantes EPS de Química Biológica, quienes recibieron una inducción sobre las características de las muestras que se debían recolectar y la forma correcta de preservación de las mismas. Se les entregó formularios donde describieron las características o razones por las cuales las muestras se tomaron en cuenta para el estudio. Las muestras recolectadas se transportaron mensualmente al Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle para su tinción y análisis.

#### a. En cada hospital:

- a. Recepción y registro de muestra.
- b. Se realizó el examen macroscópico para evaluar su consistencia y la presencia de sangre y/o moco.
- c. Se observó al microscopio buscando trofozoítos y/o quistes sospechosos tanto en solución salina como lugol y el resultado se reportó en los libros de registro.
- d. Se llenó la ficha epidemiológica para el estudio con los datos de las muestras que cumplían con los siguientes criterios para recolección: A= *E. histolytica/dispar*, B= formas sospechosas, C= muestra diarreica con eritrocitos D= muestra diarreica con moco, E= muestra diarreica con eritrocitos y moco, F= algún otro motivo específico. (Anexo 4).

- e. Las muestras presuntivas de *E. histolytica/dispar* se conservaron en recipiente adecuado (Frascos con tapón de rosca) con alcohol polivinílico PVA en una porción 1:2.
- f. Las muestras se recogieron mensualmente durante las reuniones de los EPS y se transportaron a temperatura de 0 a 4°C hacia el Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala donde se evaluaron.

## G. Procedimiento

En el Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala se realizó la tinción tricrómica para protozoarios.

1. Tinción tricrómica de Wheatley para protozoarios:
  - a. Preparar un frote delgado de la muestra preservada en PVA.
  - b. Colocar el frote en alcohol-yodo durante veinte minutos.
  - c. Colocar el frote en etanol al 70% por cinco minutos.
  - d. Colocar el frote en colorante tricrómico por diez minutos.
  - e. Colocar el frote en alcohol ácido por dos o tres segundos.
  - f. Lavar el frote en etanol al 95% sumergiendo la lámina.
  - g. Colocar el frote en etanol al 95% por cinco minutos.
  - h. Colocar el frote en etanol al 95% por diez minutos.
  - i. Colocar el frote en etanol al 100% por diez minutos.
  - j. Colocar el frote en Hemo-De por diez minutos.
  - k. Montar inmediatamente el frote con un cubreobjetos.
  - l. Observar el frote teñido en aumento de 1000X en busca de quistes o trofozoítos característicos de *E. histolytica/dispar*.
2. Si es una muestra fresca:
  - a. Preparar el frote delgado de la muestra fresca sin dejar que seque.
  - b. Colocar el frote en fijador de Schaudinn durante treinta minutos.
  - c. Lavar el frote en etanol al 70% durante un minuto.

- d. Colocar el frote en alcohol-yodo durante un minuto.
- e. Después de esto, seguir los pasos de la técnica anterior (desde el inciso “c”).

Como control de calidad para el estudio, después que los frotos teñidos fueron revisados por la tesista, también fueron evaluados por el personal técnico y profesional del Laboratorio de Parasitología del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala para disminuir el error por observación.

Los resultados obtenidos se compararon con los resultados por observación en fresco enviados por cada hospital nacional y se hicieron los cálculos estadísticos para establecer la concordancia entre ambos métodos.

## VIII. RESULTADOS

A continuación se presenta la clasificación general de las muestras incluidas en el estudio, de acuerdo a los criterios establecidos para su recolección (tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de muestras recolectadas según los criterios establecidos.

Criterio	Cantidad
A	110
B	30
C	4
D	12
E	13
F	0
<b>TOTAL</b>	<b>169</b>

Fuente: Datos experimentales

Los resultados obtenidos después del análisis de las muestras con la tinción tricrómica de Wheatley, mostraron que los leucocitos y *E. coli* suelen ser las estructuras más reportadas en las muestras referidas por los hospitales nacionales, con 48 y 38 casos respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Número de casos de parásitos y artefactos encontrados con la tinción tricrómica de Wheatley.

Criterio	Casos encontrados							TOTAL	
	NSOP	<i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. histolytica/dispar</i>	<i>E. nana</i>	Leucocitos		Otros
A	13	3	26	4	17	8	33	6	110
B	5	2	5	3	0	1	8	6	30
C	1	0	0	0	0	0	3	0	4
D	2	2	2	0	0	0	3	3	12
E	0	1	5	0	0	4	1	2	13
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>38</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>48</b>	<b>17</b>	<b>169</b>

NSOP: No se observaron parásitos.

Fuente: Datos experimentales.

Con base en los resultados obtenidos de las observaciones microscópicas mediante la tinción tricrómica, se estableció que los verdaderos positivos para *E. histolytica/dispar* constituyeron el 78% de las muestras, y los falsos diagnósticos el 10%.

Tabla 3. Verdaderos y falsos diagnósticos para *E. histolytica/dispar* determinados mediante la tinción tricrómica de Wheatley.

		EXAMEN EN FRESCO					
		POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL	
TINCIÓN TRICRÓMICA	POSITIVOS	17	10%	0	0%	17	10%
	NEGATIVOS	131	78%	21	12%	152	90%
	TOTAL	148	88%	21	12%	169	100%

Fuente: Datos experimentales.

Con los datos anteriores se calculó el índice Kappa (k) para este estudio, para lo cual se utilizó el módulo de cálculo del programa Epidat versión 3.0, quedando de la siguiente manera:

$$k = 0.0312$$

Valor de referencia: (0 a 1)

Intervalo de confianza del 95% = (0.0117 a 0.0508)

Para interpretar el valor de k es necesario utilizar la escala de criterios de Fleiss, en la que puede observarse que el valor obtenido para el índice Kappa en este estudio demuestra que no existe concordancia entre el método de observación en fresco y la tinción tricrómica de Wheatley.

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, referidos al análisis de muestras fecales para comparar el método convencional utilizado en los hospitales nacionales con la tinción tricrómica de Wheatley en el diagnóstico de *E. histolytica/dispar*, se observó que de un total de 169 muestras, 110 fueron reportadas positivas en los hospitales mediante observación en fresco, de las cuales, utilizando la tinción tricrómica, solamente se encontraron 17 casos confirmados positivos. De las 59 muestras restantes del total recolectado, 38 contenían células o artefactos, quistes y/o trofozoítos de otros protozoarios y algunos huevos de helmintos y 21 muestras fueron reportadas sin parásito alguno.

De acuerdo al criterio "A", que corresponde a muestras que al ser analizadas por el examen en fresco se diagnosticaron como positivas para *E. histolytica/dispar*, se obtuvo un total de 110 muestras, siendo todas de consistencia diarreica y 37 de ellas contenían sangre y moco, entre estas se encontraron las muestras confirmadas positivas, lo cual comprueba lo reportado en la literatura en cuanto a las características de las muestras que contienen este parásito (1).

Para el criterio "B", que corresponde a muestras recolectadas por presentar formas sospechosas para *E. histolytica/dispar*, se recolectó un total de 30 muestras de consistencia diarreica que fueron reportadas en los hospitales de origen como negativas para este protozoario, pero se enviaron como parte del estudio para confirmar el resultado y detectar algún falso negativo, y, al analizarlas mediante la tinción tricrómica se encontró leucocitos, debris fecal o trofozoítos de otros parásitos protozoarios, determinándose que en este estudio no hubo muestras diagnosticadas falsamente negativas para el parásito.

En las muestras correspondientes a los criterios C, D y E, se encontró algunos casos en los que predominó *B. hominis*, y casos no significativos de otros parásitos, helmintos y artefactos entre los que se puede mencionar *G. intestinalis*, *D. fragilis*, *I. butschlii*, *T. trichiura*, *A. lumbricoides* y levaduras, los que en algunos casos se encontraban junto con leucocitos o debris fecal, por lo que las manifestaciones de alguno de estos parásitos (diarrea, sangre o moco) con la morfología de artefactos o células pudieron dar lugar a un falso diagnóstico de *E. histolytica/dispar*.

Cabe recordar que, aún cuando haya muestras que presenten características sugestivas de amebosis, puede o no observarse el parásito. Esto puede deberse, aparte de que no se tenga el conocimiento o experiencia suficientes para identificarlo, a que no se estén excretando quistes o trofozoítos suficientes para ser observados en la muestra. Por tal razón se recomienda la evaluación de 3 muestras seriadas. Otra razón podría ser también una infección causada por alguna bacteria (por ejemplo *Shigella* sp.), por tanto, sería recomendable hacer un coprocultivo de dicha muestra.

Los frotos de las muestras analizadas previamente con el método en fresco, coloreados con la tinción tricrómica fueron útiles para diferenciar entre *E. histolytica/dispar* y otros protozoarios intestinales, ya que, para esta técnica de tinción se utilizó el fijador de Schaudinn, el cual preservó la morfología de los quistes y principalmente la de los trofozoítos, en este caso, los de *E. nana* y *E. coli*; también porque los componentes de la tinción tricrómica tienen una fuerte afinidad a la cromatina, por lo que esta se tiñó de forma clara y prominente, lo que hizo posible diferenciar los protozoarios por la disposición de su cromatina nuclear, especialmente en el caso de los trofozoítos (Anexo 1). El citoplasma tanto de ambos estadios de los protozoarios como el de los leucocitos se observó de color verde azulado en un fondo pálido, mientras que la cromatina en el núcleo apareció de un color morado rojizo.

Como se mencionó anteriormente, utilizando la tinción tricrómica, solo 17 muestras fueron positivas para *E. histolytica/dispar*; se puede observar que la mayor parte de los diagnósticos fue confirmada como leucocitos, los cuales son fácilmente confundidos con quistes de *E. histolytica/dispar* al utilizar el método de observación en fresco, principalmente porque con este método el núcleo de ambos no puede definirse bien. Puede observarse también que *E. coli* presentó un diagnóstico elevado, lo cual indica que este todavía sigue confundiendo con los quistes de *E. histolytica/dispar*, principalmente si se encuentra en fase de prequiste o trofozoíto. En todos los casos en los que se observó *E. nana*, este se encontraba en fase de trofozoíto, lo cual indica que existe dificultad para establecer una diferencia clara entre los trofozoítos de cada protozoario utilizando el método en fresco (Anexo 2). Entre las muestras también se encontró algunos casos de *E. hartmanni*, cuyo quiste y trofozoíto son morfológicamente similares a los quistes y trofozoítos de *E. histolytica/dispar*, y para establecer la diferencia entre ambos es necesario utilizar un microscopio con micrómetro, ya que *E. histolytica/dispar* es de mayor tamaño que *E. hartmanni* (Anexo 2 y 3).

De las 17 muestras positivas confirmadas para *E. histolytica/dispar*, 4 casos (24%) eran provenientes de hospitales del interior del país, y 13 muestras confirmadas (76%) eran oriundas de la capital. Estos resultados pueden atribuirse a que probablemente, la mayoría de los laboratorios de hospitales nacionales del interior del país no cuentan con microscopios con micrómetro, lo que les ayudaría a disminuir los falsos diagnósticos; también factores como las condiciones climatológicas de una región determinada (calor, humedad) unidas a la falta de un plan de mantenimiento y servicio del equipo óptico pueden ser determinantes en el deterioro de este, impidiendo tener una visión clara durante el análisis de la muestra. Otra razón puede ser que debido al volumen de muestras que se reciben en los hospitales, éstas no son analizadas detenidamente durante un tiempo apropiado, perdiendo así el detalle de los parásitos y artefactos, puede ser también que el personal técnico no es evaluado constantemente para determinar su capacidad en la identificación de parásitos amebianos; por el contrario, los laboratorios de los hospitales que se encuentran en la ciudad capital, pueden contar con equipo en mejores condiciones, los resultados son supervisados por un químico biólogo encargado del laboratorio además del estudiante de EPS, lo que permite una mayor posibilidad de capacitar y evaluar a los técnicos constantemente en cuanto al cuidado y análisis de muestras, lo que no ocurre en los hospitales del interior, ya que los encargados del laboratorio son únicamente los estudiantes que ejercen su EPS, y en algunas ocasiones deben atender reuniones mensuales y actividades fuera de su lugar de trabajo asignado, por lo que si surge un resultado dudoso, el personal técnico lo reporta según su criterio y desecha las muestras sin que éstas sean revisadas para aclarar el diagnóstico; sin embargo, esto no significa que todos los resultados reportados en la capital sean certeros, ya que hubo gran cantidad de falsos positivos provenientes de ese lugar, pero, por las condiciones mencionadas anteriormente, hay mayor posibilidad de una correcta identificación.

Los resultados reportados con el método en fresco específicamente para *E. histolytica/dispar*, de un total de 169 muestras, mediante la tinción tricrómica se confirmó 17 verdaderos positivos (10%), 131 falsos positivos (78%), 21 verdaderos negativos (12%) y ningún falso negativo (0%); estos resultados indican que, utilizando solamente la observación de muestras fecales en fresco, se reportan muchos más casos positivos para *E. histolytica/dispar* de los que realmente hay, y cuando se observan formas sospechosas de este protozoario se opta por reportar que el parásito no se observó pudiendo dar lugar a falsos negativos, aún cuando en este estudio no se dio el caso.

En base a estos resultados, se obtuvo un valor para el índice Kappa de 0.0312, el cual es muy bajo, dado que se esperaba obtener un valor mínimo de 0.75 para establecer concordancia; por lo que, de acuerdo a los criterios de Fleiss, se determinó que no existe concordancia entre ambos métodos.

## X. CONCLUSIONES

1. Los leucocitos y quistes de *E. coli* son frecuentemente confundidos con quistes de *E. histolytica/dispar* por el método de observación en fresco.
2. La tinción tricrómica de Wheatley permitió observar y diferenciar las estructuras internas de protozoarios y artefactos debido a que los componentes de dicha tinción tienen una fuerte afinidad a la cromatina, por lo que esta se tiñó de forma clara y prominente, lo que hizo posible diferenciar los protozoarios por la disposición de su cromatina nuclear, por lo que demostró ser un método de diagnóstico recomendable para disminuir los falsos diagnósticos de *E. histolytica/dispar*.
3. El porcentaje de falsos positivos para *E. histolytica/dispar* reportados mediante el método convencional fue de 78%, lo que indica que existe un sobrediagnóstico de este protozoario.
4. No existe concordancia entre el método convencional y la tinción tricrómica de Wheatley para el diagnóstico de *E. histolytica/dispar*.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar la utilización de la tinción tricrómica de Wheatley en los laboratorios de los hospitales nacionales para confirmar la presencia de *E. histolytica/dispar* en muestras sospechosas.
2. Utilizar microscopios con micrómetro para poder diferenciar entre los quistes de los protozoarios, especialmente entre *E. histolytica/dispar* y *E. coli* y entre *E. histolytica/dispar* y *E. hartmanni*.
3. Capacitar y evaluar constantemente al personal técnico de los laboratorios de los hospitales nacionales del país respecto a las medidas de mantenimiento del microscopio y la identificación y diferenciación microscópica de *E. histolytica/dispar* para ayudar a reducir la cantidad de falsos diagnósticos reportados.
4. Hacer una evaluación de los resultados comparativos de ambos métodos en un mayor número de muestra provenientes de todo el país.
5. Hacer un estudio comparando los resultados con el PCR para diferenciar *E. histolytica/dispar* y su correlación con los métodos de tinción.

## XII. REFERENCIAS

1. Mérida AMP. de, Klein RE., López B. Álvarez de Mejía M. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. p.1136-1146. (In Collins G. Encyc Env Microbiol 2002. EE.UU.: John Wiley & Sons, Inc, 2002.)
2. Levy WE. Frecuencia de falsos diagnósticos de *Entamoeba histolytica* por observación microscópica directa en cinco laboratorios de Guatemala. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín. (Tesis de graduación. Facultad de Medicina) 1993. 56p.
3. Bruckner DA. Amebosis. Clin Microbiol Rev 1992; 5:356-369.
4. Pratdesaba R. *et al.* Aislamiento y mantenimiento de una cepa nativa de *Entamoeba histolytica*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (Proyecto de investigación) 1995. 30p.
5. Ortiz, L. Parasitic infections and the Immune system. F ed. Ac Press, San Diego, CA.; 1994. p 145-162. Disponible en: <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas020723155256>.
6. Walsh, J.A. Amebosis in the World. Arch Invest Med 1997;17:385-389.
7. Diamond, L.S. and Clark C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica*. 1993. Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar*. Brumpt, 1925, J Eukaryot Microbiol 1993;40(3):340-344.
8. Walsh JA. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebosis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. Rev Infect Dis 1986; 8:228-231.
9. Sepúlveda, B. Amebosis host-pathogen biology. Rev Infect Dis 1992;4:836-842. Disponible en: [http://www.umm.edu/esp\\_ency/article/000298.htm](http://www.umm.edu/esp_ency/article/000298.htm)
10. Nauyhua, R., Ruelas, N. y Córdova E. Aislamiento de cepas de *Entamoeba histolytica* y su caracterización patogénica en la ciudad de Arequipa. Rev Per Parasitol 1997; 119-1 S.
11. Téllez A., Linder E., Meyer E. Morales W. Intestinal parasitosis in León, Nicaragua. Acta Tropica, 1997;20:589-597. Disponible en: <http://www.drrondonpediatra.com/index.htm>
12. World Health Organization. Amoebiasis Geneva reporto of a W.H.O. Expert Committee. W.H.O. Tech. Rep. Ser. 1997; No. 21. Disponible en: <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas020723155256>.
13. Ravdin, J.I. State of the art clinical article. Clin Infect Dis 1995;20:1453-1466. Disponible en: <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas020723155256>.

14. OMS. Amoebiasis: an expert consultation. Weekly Epidem Rec. Ginebra. 1997; No. 14. Disponible en: <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas020723155256>.
15. Jelinek T. *et al.* Evaluation of an Antigen-Capture enzyme Immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:752-753.
16. Melvin Dm., Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites; Methods of examination. 3 ed. E.E.U.U.:HHS Publication, 1982. XV+233p. (p 35-38).
17. Gardner B. *et al.* Comparison of Direct Wet Mount and Trichrome Staining Techniques for Detecting *Entamoeba* Species Trophozoites in Stools. J Clin Microbiol 1980;12:656-658.
18. Shoaib, S., Hafiz, A., Tauheed, S. Role of the Trichrome Staining Techniques in the diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. University Press 1998;27:152-154.
19. Rayan HZ. Microscopic overdiagnosis of intestinal amoebiasis. J Egypt Soc Parasitol 2005;35:941-951. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>
20. Estevez EG., Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. J Clin Microbiol 1985;22:666-667. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>
21. Petri Jr., WA. and U. Singh. Diagnosis and Management of Amebosis. Clin Inf Dis 1999;29:1117-1125
22. Tanyuksel M. and Petri Jr. WA. Laboratory Diagnosis of Amebosis. Clin Microbiol Rev 2003;13:334-338. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207118>
23. Bhaskar S., Singh S., Shaima M. A single step immunochromatographic test for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples. J Inm Met 1996;196:193-195.
24. Mérida AMP de. Frecuencia de la Infección por *Entamoeba histolytica* en Guatemala. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala. (Proyecto de investigación) 2003. 30p.
25. Cornejo, W; Espinoza, Y; Huiza, A; Alva, P; Suárez,R; Sevilla, C. y Náquira, C. Prevalencia de *E. histolytica* y *E. dispar* por microscopía y ELISA en muestras fecales de una población urbano-marginal de Lima. Anales de la Facultad de Medicina. 1999; 60:124-128.