

Diagnóstico de absceso hepático amibiano por prueba de difusión en agar: un método simple y eficiente con antígeno no axénico

Renato Tasca¹, Carmen Elena de Sánchez² y Rabagly Jiménez³

RESUMEN

El diagnóstico de absceso hepático amibiano es frecuentemente difícil. Por este motivo se han adaptado muchas pruebas serológicas para amibiasis pero por diversas razones (costos altos, falta de equipo especial y de personal entrenado) no se pueden emplear en la mayoría de los países en desarrollo.

Los autores realizaron dos pruebas de difusión en agar donde se comparan dos antígenos solubles de *Entamoeba histolytica*, uno preparado con amibas locales que se cultivaron en el medio modificado de Boeck y Drbohlav (difásico) con flora fecal y otro con trofozoitos de *E. histolytica* cultivados axénicamente. En los 38 sueros que se estudiaron (22 de personas con absceso hepático amibiano, 6 de pacientes con otras enfermedades y 10 de controles sanos) mediante la difusión con gel de agar se obtuvieron resultados idénticos al utilizar ambos antígenos. Estos hallazgos sugieren que el antígeno local es confiable y puede constituir en los países en desarrollo una alternativa adecuada para el serodiagnóstico del absceso hepático amibiano.

El diagnóstico de absceso hepático amibiano (AHA), una enfermedad común en muchos países en desarrollo, es difícil con mucha frecuencia porque la aspiración de tejido hepático,

1. Investigador Asociado, Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM), Tulane University-COLCIENCIAS, Apartado Aéreo 5390, Cali, Colombia y el Instituto de Enfermedades Infecciosas, Turín, Italia.
2. Profesor Asistente, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Residente, Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia.

particularmente en adultos, es un procedimiento terapéutico más que una herramienta de diagnóstico¹⁻³. Si tiene indicación, se debe efectuar con cuidado para evitar infecciones bacterianas y si el absceso está en el lóbulo izquierdo, hay que tomar precauciones adicionales^{2, 3}. Cuando se realiza este procedimiento, el examen del pus es por lo general negativo para trofozoitos de *E. histolytica*. Por estas razones, se han empleado varias pruebas serológicas para ayudar en el diagnóstico de esta afección: hemoaglutinación indirecta (HI)^{4,5}, difusión en gel de agar (DGA)^{6, 7}, contra-electroforesis (CEF)^{8, 9}, inmunofluorescencia (IF)¹⁰ y ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)¹¹⁻¹⁴. Todas estas pruebas han demostrado ser útiles en el diagnóstico de AHA, aunque los resultados positivos pueden indicar infecciones remotas con anticuerpos de larga persistencia. Sin embargo, debido a falta de fondos, de equipo o de personal entrenado, estas pruebas que incluyen los juegos de reactivos comerciales, no se emplean en la mayoría de los países en desarrollo.

El propósito del presente estudio fue comparar dos antígenos solubles de *E. histolytica*, uno preparado en Cali a partir de amibas de un portador asintomático, en medio modificado de Boeck y Drbohlav con flora fecal y otro que se hizo con *E. histolytica* cultivada axénicamente (libre de bacterias). Para determinar la sensibilidad y la especificidad de ambos antígenos y de las pruebas, se emplearon sueros humanos previamente examinados por HI para amibiasis.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno. Los quistes de *E. histolytica* se obtuvieron en Cali, Colombia, de solamente una muestra fecal de un portador asintomático. Alrededor de 1 g de heces frescas se diluyó en 10 ml de agua corriente y esta mezcla se centrifugó a 2 500 rpm durante 1 minuto. El sedimento con los quistes maduros se inoculó en tubos con medio modificado de Boeck y Drbohlav¹⁵. El desarrollo de los trofozoitos en este medio alcanzó su máximo a las 48 h de incubación a 37°C. Entonces se eligió este período para cosechar los trofozoitos con el siguiente procedimiento: se suspendieron las amibas en 50 ml

de solución de Locke, se lavaron 3 veces y se concentraron por centrifugación a 2 500 rpm por 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 ó 3 veces su volumen en solución de Locke y los trofozoitos se contaron en un hemocitómetro. La suspensión amibiana se congeló y descongeló 3 veces para centrifugarla luego a 15 000 rpm a 0°C durante 30 minutos. El sobrenadante se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su empleo. Cuando fue necesario, este antígeno se diluyó en agua destilada estéril para obtener una concentración equivalente a 10 x 10⁶ trofozoitos por ml.

El segundo antígeno lo proporcionó el Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (CDC, Atlanta). La cepa HK-9 de *E. histolytica* se cultivó en medio axénico. Este antígeno es el mismo que se emplea en el CDC para la prueba de HI.

Difusión en gel de agar. La DGA se realizó en cajas de Petri de 10 x 10 según la descripción de Ouchterlony¹⁶. El orificio central, con un diámetro de 3 mm, se llenó con 20 µl de antígeno, mientras los 6 orificios periféricos (2.5 mm de diámetro) se llenaron con 15 µl de suero del paciente sin diluir. Las pruebas se leyeron a las 24 y 48 h.

Sueros y pacientes. Entre mayo de 1977 y octubre de 1981 se colectaron 28 muestras de suero de pacientes en el Hospital Universitario del Valle (HUV) en Cali, Colombia. De los 28 pacientes, 22 se consideraron como casos altamente probables de AHA, mientras que en 6 se diagnosticaron otras enfermedades. De los 22 pacientes con AHA muy probable, a 16 se les hizo centelleografía de hígado que demostró una masa hepática en 13; el resultado fue dudoso en 2 y negativo en 1. Además, en 13 personas con AHA una punción de la masa hepática produjo un pus con el aspecto característico de "pasta de anchoa" en 11. La totalidad de los 22 enfermos tenía una historia típica de AHA y hubo una mejoría clínica marcada luego del tratamiento antiamibiano. En los 6 individuos restantes, originalmente considerados como casos clínicos compatibles con AHA, luego de otros estudios se identificaron las siguientes entidades: anemia falciforme, hepatitis viral, neumonía, colecistitis, sprue tropical y empiema pleural sin evidencia de AHA. No respondieron al tratamiento con metronidazol y los resultados de la prueba de HI, que llegaron luego que los pacientes habían sido dados de alta,

fueron negativos a excepción de uno. Además, también se examinaron por DGA 10 sueros de personas sanas sin historia de absceso hepático o disentería.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas serológicas se resumen en el Cuadro 1. Se obtuvieron idénticos resultados con los dos antígenos empleados en la DGA: 19 (86.5%) de los 22 sujetos con AHA fueron positivos; por otro lado, la prueba de HI fue positiva en 21 (95.5%). No obstante la diferencia entre la sensibilidad de HI y DGA utilizando la prueba de Mc Nemar no fue estadísticamente significativa. El caso de anemia falciforme fue positivo con título alto para HI (1:512). Un enfermo con AHA fue negativo tanto para la DGA como en la HI. Dos pacientes con AHA fueron positivos en HI pero resultaron negativos con la DGA. No se observaron falsos positivos en la prueba de DGA.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la prueba de difusión en gel de agar efectuada con antígeno de *E. histolytica* producido localmente, empleando el medio modificado de Boeck y Drbohlav contaminado con microbios para cultivar amibas, no fueron diferentes de los obtenidos en estudios paralelos con un antígeno producido a partir de *E. histolytica* en un medio axénico (libre de gérmenes).

En este último tipo de medio se puede obtener una gran cantidad de trofozoitos y por tanto de antígeno de una sola vez. La falta de contaminación microbiana debería disminuir teóricamente la tasa de reacciones falsas en las pruebas serológicas. Sin embargo, en la comparación de los dos antígenos, la especificidad y la sensibilidad resultaron iguales, aunque la sensibilidad de la DGA fue más baja que la obtenida con la HI (86.5% contra 95.5%).

A pesar de esta limitación, los autores creen que en los países en desarrollo donde los recursos económicos son bajos y los equipos comerciales resultan caros, la obtención de un antígeno conseguido por cultivo de *E. histolytica* local en medio modificado de Boeck y Drbohlav podría ser una herramienta útil adicional para ayudar al clínico en el diagnóstico de abscesos hepáticos amibianos. Además, el bajo costo de esta

Cuadro 1
Comparación de Tres Procedimientos Serológicos en el Diagnóstico de Absceso Hepático.
Cali, Colombia

Pacientes	Prueba de difusión en agar con antígeno de								Hemoaglutinación indirecta			
	Medio modificado B-D*				Medio axénico				Positivo		Negativo	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Absceso hepático amibiano (n = 22)	19	86.5	3	13.5	19	86.5	3	13.5	21	95.5	1	4.5
Otras enfermedades (n = 6)	0	0	6	100.0	0	0	6	100.0	1	16.7	5	83.3
Controles sanos (n = 10)	0	0	10	100.0	0	0	10	100.0	No se hizo			

*B-D = Boeck y Drbohlav.

técnica puede constituir una ventaja en el desarrollo de encuestas epidemiológicas.

En la presente evaluación la sensibilidad de la prueba es similar a los resultados obtenidos por otros autores. Patterson y col.¹⁷ comunicaron 95% de positividad en pacientes con AHA al emplear DGA o HI. Powell y col.¹⁸ encontraron anticuerpos contra *E. histolytica* en 96% de 360 pacientes con AHA comprobado y en 90% de 168 individuos con AHA diagnosticado mediante DGA. Saravia y col.¹⁹ encontraron resultados similares en un estudio llevado a cabo en Cali, Colombia.

Quizás debido en parte al número reducido de individuos estudiados no se observó ningún resultado falso positivo entre controles sanos o pacientes con diagnóstico diferente a AHA con la DGA, mientras que en los estudios que se mencionaron antes sí tenían resultados de falsos positivos que variaban de 0 a 16%, según las condiciones consideradas. Como la serología registra tanto infecciones previas como actuales, no es sorprendente observar una baja tasa de discrepancia entre el diagnóstico clínico y la serología. Sin embargo, cuando se evalúe el diagnóstico clínico de un absceso hepático amibiano, es de utilidad disponer de una prueba serológica, teniendo en cuenta que últimamente los criterios clínicos deben determinar el tratamiento.

SUMMARY

The agar gel diffusion (AGD) was performed in 38 persons using an antigen obtained from *E. histolytica* trophozoites cultured directly from feces in Boeck and Drbohlav diphasic medium microbially contaminated. Twenty two of 38 persons had clinically proven amoebic liver abscess (ALA), 6 had other diseases and 10 were healthy controls. The test was positive in 19 (86.5%) of the 22 patients with ALA. The six patients with other diseases and 10 healthy controls were negative.

Identical AGD results were obtained with an antigen prepared from amoebae grown in axenic medium. Sera were also studied with indirect hemoagglutination (IHA) test, which was insignificantly more sensitive but less specific than AGD (IHA sensitivity: 95.5%). A patient with sickle-cell anemia, but with no evidence of ALA resulted positive with IHA and negative with AGD. No false positive results were observed using AGD. Perhaps the most important consideration of the reported experience is that antigen obtained from *E. histolytica* trophozoites grown in Boeck and Drbohlav diphasic medium in the presence of intestinal flora, proved efficient and reliable in AGD test employed as a serodiagnostic aid for amoebic liver abscess.

In addition, the low cost and simplicity are also advantages of the described AGD test. The authors believe that this test

provides an alternative serodiagnostic approach accessible to laboratories and clinicians responsible for diagnosing amoebic liver abscess and other invasive forms of amebiasis in developing countries, where commercial kits have proven too expensive or are unavailable.

REFERENCIAS

1. Adams, E. B. y Macleod, I. M.: Invasive amoebiasis. II. Amoebic liver abscess and its complications. **Medicine**, 1977, **56**: 325-334.
2. D'Alessandro, A. y Mayoral, L. G.: Amoebiasis. Pp 2-5, in **Current Therapy**, Philadelphia, Conn & Saunders, 1977.
3. D'Alessandro, A. y Mayoral, L. G.: Tratamiento de las protozoosis intestinales. **Acta Médica Colombiana**, 1972, **7**: 33-47.
4. Kessel, J. F., Lewis, W. P., Pasquel, C. M. y Turner, J. A.: Indirect hemoagglutination and complement fixation test in amoebiasis. **Am J Trop Med Hyg**, 1956, **14**: 540-550.
5. Kelly, P.: Serologic tests for diagnosing invasive amebiasis: counter-immunoelectrophoresis and indirect hemoagglutination. P. 301 in: **Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology**, 1980.
6. Maddison, S. E., Powell, S. J. y Elsdon-Dew, R.: Application of serology to the epidemiology of amoebiasis. **Am J Trop Med Hyg**, 1965, **14**: 554-557.
7. Maddison, S. E.: Characterization of *E. histolytica* antigen-antibody reaction by gel diffusion. **Experimental Parasitology**, 1965, **16**: 224-235.
8. Krupp, I. M.: Comparison of counter-immunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. **Am J Trop Med Hyg**, 1974, **23**: 27-30.
9. Farid, A., Hassan, B., Trabolsi, G. I., Higashi, N. S., Mansour, N. y Miner, W. F.: Hepatic amebiasis: diagnostic immunoelectrophoresis and metronidazole therapy. **Am J Trop Med Hyg**, 1977, **26**: 822-823.
10. Ambroise-Thomas, P. y Truong, T. K.: Fluorescent antibody test in amebiasis. **Am J Trop Med Hyg**, 1972, **21**: 907-912.
11. Ambroise-Thomas, P., Desgeorges, P. T. y Monget, D.: Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une micromethode modifiée. 2. Resultats pour la toxoplasmose, l'amibiase, la trichinose, l'hydatidose et l'aspergillose. **Bull Org Mond Santé**, 1978, **56**: 797-804.
12. Cross, J. H. y Chi, J. C. H.: The ELISA test in the detection of antibodies to some parasitic diseases in Asia. **Proceedings of the 18th Seamtroped Seminar**, 1978, pp. 178-182.
13. Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. y Edwards, R.: A comparison of isotopic and enzyme immuno assay for tropical parasitic diseases. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, 1977, **71**: 431-437.
14. Yang, J. y Kennedy, T.: Evaluating of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of amebiasis. **J Clin Microbiol**, 1970, **10**: 778-785.
15. Reardon, L. V. y Rees, C. V.: The cultivation of *E. histolytica* without serum. **J Parasitol**, 1939, **25**: (Suppl.), 13-14.
16. Ouchterlony, O.: Antigen-antibody reaction in gels: types of reaction in coordinated systems of diffusion. **Exper Parasitol**, 1953, **16**: 224-225.
17. Patterson, M., Healy, G. R. y Shabot, J. M.: Serologic testing of amebiasis. **Gastroenterology**, 1980, **78**: 136-141.
18. Powell, S. J., Maddison, S. E., Hodgson, R. G. y Elsdon-Dew, R.: Amoebic gel diffusion precipitin test. Clinical evaluation in amoebic liver abscess. **Lancet**, 1980, **2**: 602-603.
19. Saravia, N. G., Dover, A. S. y Mayoral, L. G.: Serología en el diagnóstico diferencial del absceso amibiano del hígado. **Acta Méd Valle**, 1976, **3**: 93-97.