

# Diagnóstico de absceso hepático amibiano mediante el inmunoensayo enzimático ligado a una enzima (ELISA)

AMANDA CASTAÑO GONZÁLEZ, ARTURO JARABA MEDINA,  
ASTRID GÓMEZ MUÑOZ, JORGE BOTERO GARCÉS

**E**L ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO (AHA) es la complicación extraintestinal más frecuente de la amibiasis; su cuadro clínico es generalmente agudo y se lo considera una urgencia médica. Se manifiesta con síntomas generales, acompañado de dolor en hipocondrio derecho, que se puede irradiar al hombro; la hepatomegalia dolorosa es un signo sugestivo pero no diagnóstico; debe diferenciarse del absceso hepático piógeno y del hepatoma necrótico; para el enfoque diagnóstico se requieren ayudas imaginológicas y pruebas de laboratorio como las inmunológicas. En este estudio se puso a punto la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-amibianos en sueros controles de pacientes con AHA, estandarizada en el Instituto Nacional de Salud de Bogotá. Además se evaluaron 67 muestras de pacientes con sospecha clínica de AHA, procedentes del Hospital González Valencia de Bucaramanga y del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín. El 70.2% de los sueros problema evaluados fueron positivos, con una tasa de positividad significativamente mayor en los procedentes de Bucaramanga.

.....  
AMANDA CASTAÑO GONZÁLEZ, Bacterióloga, MSc en Parasitología, profesora Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. ARTURO JARABA MEDINA, Bacteriólogo. ASTRID GÓMEZ MUÑOZ, Bacterióloga. JORGE BOTERO GARCÉS, MD, MSc en Inmunología, profesor Facultad de Medicina. Todos de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Entidad financiadora del proyecto, Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), U. de A.

## **PALABRAS CLAVE**

ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO

AMIBIASIS

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

ELISA

## **INTRODUCCIÓN**

LOS ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS REALIZADOS hasta el momento han demostrado que en la población mundial la prevalencia de infección por *Entamoeba histolytica* es de aproximadamente el 10% (1) y en Colombia, según la encuesta nacional de morbi-mortalidad de 1981, era del 12.1% (2). Cada año se registran 50 millones de casos de enfermedad amibiana invasora y de éstos se producen 100 mil muertes (1). La enfermedad invasora puede limitarse únicamente a la mucosa colónica, ocasionando colitis amibiana aguda (disentería amibiana) o diseminarse extraintestinalmente para producir absceso hepático amibiano (AHA), amibiasis pleuropulmonar, peritoneal, pericárdica, cerebral, cutánea o genitourinaria (3).

El AHA es el más común de los síndromes amibianos extraintestinales y es la principal causa de morbilidad y mortalidad debidas a amibiasis en todo el mundo (3). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que actualmente existen 40 a 50 millones de casos de AHA y colitis invasora por *E. histolytica* (4). En Colombia, aunque la amibiasis y el AHA han sido objeto de investigación durante varios años, no se conoce la prevalencia exacta (1). En estudios de autopsias en zonas endémicas se ha encontrado la presencia de AHA entre el 0.2 y el 5% y como causa de admisión hospitalaria en estas

zonas, el AHA contribuye con 0.1% a 1.2% de los pacientes (5).

Desde el punto de vista clínico el AHA se manifiesta con debilidad general, febrículas, anorexia y dolor punzante, que está presente en la mayoría de los casos; su localización, intensidad e irradiación son variables, aunque es más frecuente en el hipocondrio derecho; a la palpación el paciente experimenta dolor intenso que aumenta con la inspiración profunda (5). Para el estudio del AHA se ha recurrido a varias ayudas diagnósticas, principalmente de imágenes radiológicas que, además de tener una baja especificidad, son poco accesible a la comunidad por su alto costo (6); otro de los procedimientos empleados es la punción hepática para aspirado y biopsia, que es muy invasora para el paciente y tiene una alta frecuencia de efectos colaterales; además, no siempre es posible la identificación del agente etiológico en el material extraído (7).

En nuestro medio es necesario hacer el diagnóstico diferencial con el absceso hepático piógeno, ya que clínica y radiológicamente son similares (1). Por lo tanto, se recomienda que además de las ayudas imaginológicas se determinen en el suero los anticuerpos específicos contra *E. histolytica* y se hagan hemocultivos para confirmar o descartar la presencia de *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp, *Citrobacter* spp, y otras bacterias (3); esto con el propósito de definir la etiología del absceso hepático y de esta manera instaurar un tratamiento más oportuno y racional y así evitar las complicaciones severas que producen una alta morbimortalidad (8,9).

En los países tropicales considerados como áreas endémicas se han usado varias técnicas inmunológicas para el diagnóstico serológico del AHA (10), como la inmunodifusión, la hemaglutinación, la fijación del complemento etc., pero los resultados no

han sido lo suficientemente confiables (11). En 1971 Sepúlveda y colaboradores iniciaron el uso de la contrainmunolectroforesis en el diagnóstico serológico de la amibiasis invasora; la reacción mostró una sensibilidad del 98% y una especificidad del 94%. Se aceptó desde entonces que éste es un método serológico rápido, simple y sensible para el estudio epidemiológico de la amibiasis (12). Sin embargo, en un trabajo realizado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, se estandarizó la técnica del ensayo inmunoenzimático, ELISA, para la detección de anticuerpos circulantes contra trofozoítos de *E. histolytica*. Este trabajo dio resultados similares a los obtenidos mediante la contrainmunolectroforesis, con una sensibilidad del 95.7% y una especificidad del 100%, con la ventaja de que la prueba de ELISA tiene bajo costo (6,7). El objetivo de este estudio fue poner a punto la prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos de tipo IgG contra *E. histolytica*, de acuerdo con la prueba estandarizada por el Instituto Nacional de Salud, de Bogotá, Colombia (INAS); ello con el fin de disponer de una herramienta diagnóstica en el laboratorio de Parasitología Intestinal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, para beneficio de los pacientes que consultan por cuadros clínicos sugestivos de absceso hepático; de esta manera se ofrece una opción diagnóstica más con el propósito de agilizar la resolución de su enfermedad.

Por lo anteriormente expuesto, nos propusimos determinar la reproducibilidad de la prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA), estandarizada por el INAS para la detección de anticuerpos anti-amibianos en sueros controles para el diagnóstico de AHA; con la puesta a punto de esta prueba y su ejecución se pudo observar que nuestra técnica se ajustaba a la prueba estandarizada en el INAS desde los puntos de vista técnico y estadístico; además, se hizo el diagnóstico por laboratorio a 67

muestras de suero obtenidas de pacientes con sospecha clínica e imagenológica de AHA en Bucaramanga y Medellín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de referencia

SE ESTUDIARON **4** SUEROS POSITIVOS Y **2** NEGATIVOS para AHA suministrados y codificados por el INAS (Tabla N° 1). El título del conjugado óptimo reportado por dicha institución fue de 1: 4.000 y el del suero de 1:400.

Tabla N° 1  
DENSIDADES ÓPTICAS DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA

CÓDIGO SUERO	NEGATIVO	POSITIVO
SCN 2	0.193	
SCN 41	0.045	
SCP 18		1.313
SCP 19		0.882
SCP 25		0.674
SCP 40		1.082

SCP: suero control positivo  
SCN: suero control negativo

### Muestras problema

EN TOTAL SE ANALIZARON **67** MUESTRAS DE SUEROS de pacientes con sospecha clínica de AHA, 48 de ellas remitidas del hospital González Valencia, de Bucaramanga, y 19 procedentes del Hospital Universitario San Vicente de Paúl, de Medellín.

**Antígeno:** se obtuvo de cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica*, cepa HMI incubados en el medio de cultivo de Diamond.

**Conjugado:** se efectuó la titulación del anticuerpo específico anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma A-0287 ), para su posterior uso.

**Técnica de ELISA:** se realizó de acuerdo con el protocolo del INAS, como sigue: a cada uno de los 96 pozos de las placas (Dynatech Immulon 1-0110103555) se le agregaron 100ml de una solución de antígeno de trofozoítos de *E. histolytica*, a una concentración de 1.25  $\mu$ g/ml, disuelto en una solución de carbonato/bicarbonato y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se lavaron las placas tres veces en solución salina reguladora de fosfatos PBS (GIBCO BRL 21300) suplementada con 0.05% de Tween 20 (SIGMA P1379) (PBS-T), pH 7.2-7.4, cada vez por 5 minutos.

Cada suero se procesó por duplicado, agregando 100  $\mu$ l de suero a una dilución 1:400, se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 2 horas y se lavaron las placas con PBS-T de igual manera que en el paso anterior.

A cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ l del conjugado a la dilución 1:10.000; se incubó en cámara húmeda a 4 °C durante 18 horas, luego se procedió a repetir los pasos de lavado con PBS-T.

Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l del sustrato, p-nitrofenil fosfato (Sigma P550), a una concentración de 1 mg/ml en solución reguladora de dietanolamina pH 9.81 (SIGMA D885), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se detuvo la reacción enzimática con 25  $\mu$ l de hidróxido de sodio 3N. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un fotocolo (Benchmark 170-6850).

Se analizaron los datos de los valores de densidad óptica obtenidos de los sueros de referencia, se calculó la media de los sueros de referencia negativos con el propósito de determinar el punto de corte, el cual fue de 0.33 DO. Valores mayores que la media más dos desviaciones estándar se consideraron positivos.

**Análisis estadístico:** con el propósito de evaluar la titulación del conjugado y la reproducibilidad de la prueba realizada en el laboratorio de Parasitología Intestinal, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, con respecto a la prueba del INAS, se compararon las medias y las varianzas de las densidades ópticas suministradas por el INAS y las obtenidas en nuestro laboratorio mediante el programa Epi-info 6.0. Para analizar los resultados obtenidos en los sueros provenientes de Bucaramanga y Medellín, se construyó una tabla 2x2, la cual se probó por medio de la prueba estadística de Mantel-Haenzel y chi-cuadrado.

## RESULTADOS

**Titulación del conjugado:** En este estudio la dilución óptima de trabajo fue de 1:10.000, determinada mediante la prueba estadística de medias y varianzas de los valores de absorbancia obtenidos con las diferentes diluciones del conjugado, comparados con los valores informados por el INAS. Al aplicar el análisis estadístico se encontró que no existían diferencias significativas entre la dilución del conjugado 1:10.000 y las descritas por el INAS,  $p=0.8765$  (tabla 2).

Tabla N° 2

### COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA A DIFERENTES DILUCIONES DEL CONJUGADO

Código suero	INAS	Lab. de parasitología intestinal (U. de A.)		
	Dilución			
	1:4.000	1:10.000	1:15.000	1:20.000
SCP 18	1.313	0.912	0.442	0.159
SCP 40	1.082	0.899	0.523	0.254
SCP 19	0.882	0.775	0.644	0.257
SCP 25	0.674	0.605	0.497	0.237
SCN 2	0.193	0.145	0.150	0.046
SCN 41	0.045	0.109	0.053	0.026

SCP: suero control positivo

SCN: suero control negativo

**Técnica de ELISA:** se logró reproducir la técnica estandarizada por el INAS, como se observa en la tabla N° 3. Los valores promedio de los sueros de referencia obtenidos en nuestro laboratorio fueron muy similares y no se encontró diferencia significativa entre las DO obtenidas y las suministradas por el INAS (Figura N° 1).

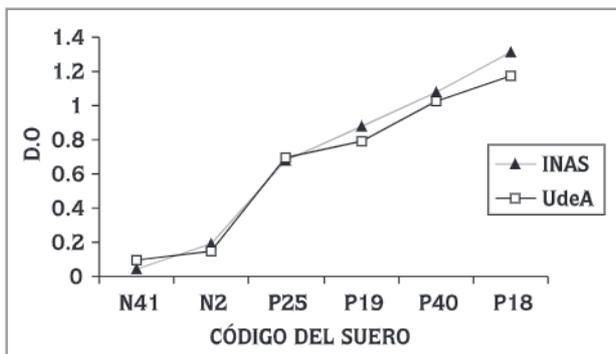
Tabla N° 3

COMPARACIÓN DE LOS VALORES PROMEDIO DE LA DENSIDAD ÓPTICA (DO) REPORTADOS POR EL INAS Y LOS OBTENIDOS EN LA SECCIÓN DE PARASITOLOGÍA INTESTINAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, MEDELLÍN-COLOMBIA

SUERO	INAS	Lab. Parasitología (UdeA)
Código	D.O.	
SCP 18	1.313	1.172
SCP 19	0.882	0.795
SCP 25	0.674	0.694
SCP 40	1.082	1.024
SCN 2	0.193	0.145
SCN 41	0.045	0.095

SCP: suero control positivo  
 SCN: suero control negativo  
 D.O. densidad óptica

Figura N° 1



**Aplicación de la técnica:** luego de verificar la reproducibilidad de la técnica del INAS, se procesaron los 67 sueros problema de pacientes con sospecha clínica de AHA. El 70.2% de ellos fueron positivos, con mayor porcentaje en los procedentes de Bucaramanga (79.2%), que en los de Medellín, (47.4%) ( $p < 0.05$ ) (Tabla N° 4).

Tabla N° 4

PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS, EN SUEROS PROBLEMA PROCEDENTES DE MEDELLÍN Y BUCARAMANGA

PROCE-DENCIA	POSITIVOS N	POSITIVOS %	NEGATIVOS N	NEGATIVOS %	TOTAL
B/MANGA	38	79.2	10	20.8	48
MEDELLÍN	9	47.4	10	52.6	19
TOTAL	47	70.2	20	29.8	67

Positivos D.O. > 0.34.

Negativos D.O. < 0.34.

N= número de sueros evaluados.

## DISCUSIÓN

LA AMIBIASIS EXTRAINTestinal ES UNA COMPLICACIÓN severa de la infección por *E. histolytica* que se presenta bajo diferentes formas según el tipo de diseminación. La más importante es el absceso hepático que en zonas endémicas contribuye como causa de admisión hospitalaria con el 0.1 a 1.2% de los pacientes y es considerado una urgencia médica (5); cuando existe esta sospecha clínica es indispensable hacer el diagnóstico diferencial con el absceso hepático de origen bacteriano. Para su diagnóstico se requieren ayudas imagenológicas costosas; sin embargo, las pruebas inmunológicas como el ELISA son de gran utilidad por su sensibilidad y especificidad.

El diagnóstico de AHA sólo puede ser confirmado mediante la demostración del parásito en el tejido hepático, por medio de la punción-biopsia, procedimiento muy invasor que en la actualidad es permitido únicamente en los casos quirúrgicos; por lo tanto, en el estudio del AHA se ha recurrido a diferentes ayudas diagnósticas como la ecografía, la tomografía computarizada y las pruebas serológicas; entre éstas las más utilizadas son el ELISA y la contraelectroforesis con sensibilidad y especificidad muy semejantes entre sí; sin embargo, el ELISA permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, no requiere equipos de laboratorio sofisticados y su costo es más bajo que el de la contraelectroforesis.

Aunque se logró la reproducibilidad de la prueba, trabajando con las mismas variantes utilizadas en el INAS, hemos propuesto hacer algunas modificaciones como acortar la incubación, debido a que en la actualidad el tiempo total para hacer esta prueba es prolongado, aproximadamente de 36 horas. Proponemos que al emplear peroxidasa en reemplazo de la fosfatasa alcalina, el tiempo se reducirá; lo anterior basados en los trabajos de Shamsuzzaman y col. (8) Kraoul y col. (13). En la actualidad en países desarrollados se están empleando estuches comerciales de alta sensibilidad y especificidad y de corta duración (14,15), los cuales pretendemos aplicar en nuestro laboratorio a mediano plazo.

Con este trabajo hemos logrado poner a punto la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG antitrofozoitos de *E. histolytica*; por consiguiente, ahora disponemos de esta valiosa herramienta diagnóstica para el estudio del comportamiento epidemiológico y clínico del AHA en nuestro medio y podremos así conocer la prevalencia real de esta entidad. Además, con la aproximación diagnóstica que esta prueba proporciona, serán factibles estudios posteriores para acceder a las técni-

cas moleculares, con el propósito de avanzar en el conocimiento de esta enfermedad de relativa frecuencia en nuestro medio.

Es importante destacar que aunque los objetivos de este estudio eran únicamente poner a punto la prueba de ELISA e implementarla como método diagnóstico, se logró aplicarla a 67 sueros de pacientes con sospecha de AHA y entregar oportunamente los resultados a los respectivos médicos tratantes (Tabla N° 4). De esta manera, el estudio pudo contribuir al enfoque diagnóstico del AHA; como se mencionó anteriormente, no existe un examen único, imaginológico ni de laboratorio, que pueda confirmar esta presunción diagnóstica; sin embargo, cuando se tiene la sospecha clínica e imaginológica de absceso hepático y se determinan los anticuerpos IgG antitrofozoito de *E. histolytica* por la técnica de ELISA, se puede decir en los casos positivos que hasta no demostrar lo contrario se trata de un AHA mientras que con resultados negativos se debe plantear otra etiología diferente de la amibiana, como la piógena.

## SUMMARY

### DIAGNOSIS OF AMEBIC LIVER ABSCESS BY MEANS OF AN ENZYME-LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY

Amebic liver abscess (ALA) is the most frequent extraintestinal complication of amebiasis; its clinical presentation is generally acute, and it is considered a medical emergency. Patients manifest general symptoms, accompanied by pain in the right hypochondrium that can irradiate to the shoulder; painful hepatomegalia is a suggestive but not diagnostic sign; it should be distinguished from pyogenic liver abscess and necrotic hepatoma; for the diagnostic approach to ALA imagenologic exams

and laboratory tests are required, among the latter the immunologic ones. In this study we used the ELISA test for the determination of antiamebic antibodies in control ALA sera, as described by the National Institute of Health Bogotá, Colombia (7). Furthermore, 67 serum samples were evaluated from patients with clinic suspicion of ALA. Of these 70.2 were positive; there was significant difference in the positivity rate between patients from two Colombia cities, those from Bucaramanga having a higher positivity rate.

## AGRADECIMIENTOS

AL COMITÉ PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN, Universidad de Antioquia (CODI) por la financiación de este proyecto; al Centro de Investigaciones de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia, por su apoyo administrativo y financiero. Al Hospital González Valencia de Bucaramanga y al Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín, por la remisión de las muestras. Al Instituto Nacional de Salud de Bogotá, por la donación de los controles. A la doctora Sonia del Pilar Agudelo, profesora del Programa para el Estudio y Control de las Enfermedades Tropicales (PECET), por la lectura y revisión crítica del artículo. Al Doctor Fernando Mozo, por el suministro de los sueros de pacientes del Hospital González Valencia y a la Doctora Sofía Duque, del INAS, por el suministro del antígeno.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ROBLES P, CASTAÑO A, MONTOYA M. Absceso hepático: diagnóstico serológico. En: Carmona J. ed. Tópicos de Infectología. Medellín: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; 1992: 107-113.
2. CORREDOR A, ARCINIEGAS E, HERNÁNDEZ C. Parasitismo Intestinal. Santa Fe de Bogotá (Col): Editorial División de Bibliotecas y Publicaciones, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud; 2000.
3. AGUIRRE A. Standardization and evaluation of differential diagnostic systems for the detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Tesis doctoral. University of London, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, 1999; 257p.
4. PETRI WA Jr, HAQUE R, LYERLY D, VINES R. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today* 2000; 16: 320-321.
5. BOTERO D, RESTREPO M. Parasitosis Humanas. 3ª ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1998; 457p.
6. VARGAS A. Absceso hepático amibiano. *Tribuna Médica* 1996; 93: 261-268.
7. NICHOLLS S, RESTREPO M, DUQUE S, LÓPEZ M, CORREDOR A. Standardization and evaluation of Elisa for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 53-58.
8. SHAMSUZZAMAN S, HAQUE R, HASIN S, HASHIGUCHI Y. Evaluation of indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunoabsorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. *J Parasitol* 2000; 86: 611-615.
9. SING K, VOHRA H, VINAYAR V, GANGUL N. Partial characterization of a 36 Kda antigen of *Entamoeba histolytica* and its recognition by sera from patients with amoebiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27: 23-30.
10. KIM H, FILKELSTEIN S. Serologic responses in amebiasis. *Arch Investigaciones Médicas (México)* 1978; 9 (Supl 1): 357-361.
11. GUHL F, MOLINA S, DELGADO P. Revisión del estado actual del diagnóstico de *Entamoeba histolytica* en Santa Fe de Bogotá DC. *Tribuna Médica* 1996; 93: 1-8.

12. SEPÚLVEDA B, LEE E, DE LA TORSE M, LANDA L. El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de inmunolectroforesis cruzada. Archivos de Investigación Médica (Mex) 1971; 2 (Supl 1): 263-268.
13. KRAUOL L, ADJMI H, LAVARDE V, PAYS JF, TOURTESCHAEFER C, HENNEQUIN C. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. J Clin Microbiol 1997; 35: 1.530-1.532.
14. BENZEGUIR AK, KETTIS AA. Evaluation of an Enzyme-Immunoassay test kit for diagnosing infections with Entamoeba histolytica. Arch Med Research 1997; 28: 276-278.
15. HUSTON CD, HAQUE R, PETRI WA, Jr. Molecular-based diagnosis of Entamoeba histolytica infection 1999; available from URL: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>.



