

---

---

## EDITORIAL

# Diagnóstico microscópico de amibiasis: Método obsoleto pero necesario en el mundo en desarrollo.

El reconocimiento de *Entamoeba dispar* y la detección de *Entamoeba moshkovskii* en humanos revelan la ineficiencia del diagnóstico microscópico para diferenciar *Entamoeba histolytica* de estas especies morfológicamente idénticas (1). Sin embargo, el hallazgo de hematofagia en trofozoítos, considerado tradicionalmente como criterio de diagnóstico definitivo de *E. histolytica*, aun se acepta como diagnóstico de esta especie en pacientes con disentería (2).

Clásicamente, *E. histolytica* se ha podido diferenciar de *E. dispar* mediante el análisis de los modelos electroforéticos de isoenzimas en lisados de cultivos de amibas (1). No obstante, este método bioquímico no es práctico en la rutina del laboratorio clínico por su complejidad, consumo de tiempo, costo y la experiencia requerida para cultivar las amibas. Las técnicas serológicas para el diagnóstico de amibiasis poseen alta sensibilidad y especificidad en la detección de los anticuerpos específicos. Sin embargo, pueden no ser de utilidad en áreas endémicas por no diferenciar las infecciones pasadas de las actuales (1). Las pruebas de detección de antígenos de *E. histolytica* en especímenes fecales son muy sensibles y específicas en casos de colitis amibiana e infección asintomática y permiten diferenciar esta especie de *E. dispar* (3). Sin embargo, el uso clínico rutinario de estos dos métodos en áreas pobres no es accesible por el costo de los reactivos.

En la era genómica de la parasitología se ha producido un cambio radical en el diagnóstico de la amibiasis; las técnicas de PCR se han convertido en los métodos de elección en el mundo industrializado, por su excelente sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la infección y por la detección y diferenciación de las tres especies de *Entamoeba* morfológicamente indistinguibles (3). No obstante, su aplicación en el diagnóstico de rutina es muy limitada y permanecen imprácticas en el mundo en desarrollo por su complejidad y costo. En estas áreas, el microscopio continúa siendo la piedra angular de los microscopistas en los laboratorios clínicos y consecuentemente, los diagnósticos erróneos de *E. histolytica/E. dispar (Eh/Ed)* continúan siendo frecuentes (4). Sin embargo, existen diversos procedimientos que permiten la detección y diagnóstico microscópico de *Eh/Ed* si son seguidos y se toman las precauciones necesarias.

Uno de los requisitos primarios para el diagnóstico correcto es el examen de especímenes fecales muy frescos, particularmente cuando existe la posibilidad de la presencia de formas tróficas. Es conocido que la eliminación de protozoos en las heces es irregular, con grandes variaciones diarias, lo cual determina la imperiosa necesidad del examen de una serie de especímenes. De acuerdo a algunos autores, se requieren tres exámenes negativos para descartar una infección amibiana (5). No obs-

tante, los resultados pueden no ser confiables si las muestras son obtenidas en días consecutivos puesto que la mayoría de los portadores de quistes los eliminan durante pocos días a intervalos diferentes (6). El número de especímenes a examinar antes de descartar la presencia de *Eh/Ed*, depende en gran parte de la experiencia del laboratorista, de las pruebas de diagnóstico utilizadas y del grado de sospecha de la existencia de una amibiasis. En nuestra experiencia, si se examinan de una a seis muestras en días consecutivos mediante frotis frescos (directos y concentrados) y frotis teñidos con hematoxilina férrica, casi todos los casos son detectados. Si los resultados son negativos y existe el criterio clínico de una amibiasis, es necesario realizar más exámenes.

El material que se vaya a examinar para detectar amibiasis debe ser estudiado mediante frotis frescos con solución salina y de yodo. El uso de un método de concentración confiable debe ser de rutina en los laboratorios de coprología; las evidencias indican un aumento apreciable del porcentaje de hallazgos positivos. Se ha sugerido el uso rutinario de la tinción de frotis con colorante tricrómico o hematoxilina férrica para el diagnóstico de *Eh/Ed* (2), lo cual consideramos como el método más crítico en el diagnóstico microscópico de la amibiasis. Nuestra experiencia en el uso rutinario de esta última técnica nos ha enseñado que el riesgo de realizar errores de diagnóstico es alto cuando se basa en el examen de frotis frescos (directos y concentrados). Si bien es cierto que, en ocasiones, no es difícil hacer el diagnóstico de *Eh/Ed* en el examen de un frotis al fresco como cuando se observa gran número de quistes tetranucleados en ausencia de otras especies de amibas o numerosos trofozoítos, muchos de ellos con eritrocitos, en un paciente con disentería, la mayoría de los especímenes no

corresponden a estas dos categorías y ameritan una cuidadosa diferenciación.

El diagnóstico diferencial microscópico de las especies de *Entamoeba* depende de rasgos citológicos finos por lo que no es adecuado su diagnóstico sin el concurso de una técnica de tinción permanente. La diversidad de especies de amibas, células y elementos de origen vegetal y animal que se puede observar en las heces ocasionan un cuadro complejo y confuso, especialmente en pacientes con procesos inflamatorios intestinales, en quienes muchas células pueden ser confundidas con *Eh/Ed* en preparaciones al fresco. Los leucocitos y macrófagos que contienen eritrocitos son diagnosticados con frecuencia como *Eh/Ed* o *E.histolytica*, respectivamente; el uso de frotis teñidos evitaría los diagnósticos incorrectos en la mayoría de los casos.

Existen diversos criterios para diferenciar los trofozoítos de *Eh/Ed* de los de *E.coli*. La identificación de trofozoítos de *Eh/Ed* se hace frecuentemente en base a su motilidad rápida, progresiva y la emisión explosiva de pseudópodos hialinos. Sin embargo, *E. coli* puede exhibir estos rasgos en ocasiones (6). Estas características son de importancia diagnóstica si las heces son recién emitidas y si se toman en cuenta otros rasgos diferenciales. La visibilidad del núcleo poco ayuda a distinguir estas especies ya que puede ser influenciada por diversos factores. No es usual que *E.coli* ingiera eritrocitos pero a veces ocurre (6). La aceptación de la presencia de amibas hematófagas como criterio diagnóstico de amibiasis, sin tomar en consideración otros rasgos morfológicos, puede conducir a diagnósticos incorrectos. Consecuentemente, se deduce que la distinción de los trofozoítos de *Eh/Ed* y *E. coli* no es una tarea fácil. Es evidente que muchos de los riesgos potenciales de realizar un diagnóstico erróneo en el examen de frotis fecales al fresco se elimi-

narían si se utilizaran tinciones permanentes. Además, amibas de pequeño tamaño como *Endolimax nana* y *Entamoeba hartmanni* podrían no ser detectadas al examen al fresco o si se detectan, los rasgos morfológicos podrían ser indistinguibles lo que impediría el diagnóstico específico correcto. Esto podría explicar la rareza del diagnóstico de *E. hartmanni* en las áreas en desarrollo incluyendo a nuestra región, donde hemos demostrado su endemicidad mediante el uso de frotis teñidos con hematoxilina férrica (7,8). Este método también nos ha permitido detectar la presencia de *Entamoeba polecki*, amiba morfológicamente similar a *Eh/Ed*, en humanos (9,10). Estos

hallazgos corroboran a este procedimiento como el paso más crítico en el diagnóstico de *Eh/Ed*. Muchos de los errores de diagnóstico y tratamientos innecesarios se evitarían si el examen al fresco, directo o de material concentrado, se considerara como un examen preliminar.

En base a cuatro décadas de experiencia, consideramos la tinción de frotis fecales con hematoxilina férrica como el método esencial y confiable para el diagnóstico microscópico de los protozoos intestinales, los cuales serían detectados, si están presentes, si se examinaran los especímenes requeridos en un tiempo mínimo de una semana.

*Leonor Chacín-Bonilla*

### **Microscopic diagnosis of amebiasis: An obsolete method but necessary in the developing world.**

Molecular biology-based diagnosis offers the best approach to detect amebiasis, but remains impractical in the clinical laboratories from the developing world. In these areas, the microscopic diagnosis remains the routine method. It is imperative that a series of fresh stool specimens be examined. The use of a concentration method should become a routine procedure. Permanent stained smears is the most critical and reliable diagnostic method for the microscopic detection of intestinal protozoa. If the direct or concentrate wet mounts were considered as a preliminary examination; and the use of iron-hematoxylin stained smears become a routine procedure, many of the misdiagnosis that frequently occur could be avoided. The iron-hematoxylin stained preparation is the method of choice for the microscopic detection of *E.histolytica/E.dispar* and other intestinal protozoa.

1. **Chacín-Bonilla L.** Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkowskii* en humanos. *Invest Clin* 2010; 51:239-256.
2. **Tanyuksel M, Petri WA Jr.** Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:713-729.
3. **Fotadar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.** Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:511-532.
4. **Leiva B, Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E.** Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006; 37: 529-534.
5. **Li E, Stanley SL Jr.** Protozoa. Amibiasis. *Gastroenterol Clin N A* 1996; 25: 471-492.

6. **Anderson HH, Bostick WL, Johnstone HG.** Amebiasis. 1<sup>st</sup> Ed. Springfield(ILL): Charles C Thomas Publisher; 1953, p 225-280.
7. **Chacín-Bonilla L, Guanipa N, Arape García R.** Prevalencia de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni* y otros parásitos intestinales en niños hospitalizados. Invest Clin 1976; 17:25-41.
8. **Chacín-Bonilla L, Guanipa N, Cano G, Parra AM, Estevez J, Raleigh X.** Epidemiological study of intestinal parasitic infections in a rural area from Zulia State, Venezuela. INTERCIENCIA 1998; 23: 241-247.
9. **Chacín-Bonilla L.** Successful treatment of human *Entamoeba polecki* infection with metronidazole. Am J Trop Med Hyg 1980; 29: 521-523.
10. **Chacín-Bonilla L.** *Entamoeba polecki*: human infections in Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 634.