

Revista Mexicana de Pediatría

Volumen 72
Volume

Número 3
Number

Mayo-Junio 2005
May-June

Artículo:

Identificación de la *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* por la técnica de amiba en fresco vs su tinción con hematoxilina-eosina en la diarrea aguda

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Sociedad Mexicana de Pediatría, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*

Identificación de la *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* por la técnica de ameba en fresco vs su tinción con hematoxilina-eosina en la diarrea aguda

(*Entamoeba histolytica*/E. *dispar* identification by hematoxylin-eosine stain technique in children with acute diarrhea)

Norberto Gómez-Rivera,* Antonio F Molina M,** Ma. Guadalupe García Z,* Juan D Castillo A,* Jaime Castillo R,* Roberto J García H,* Ignacio Fonseca Chon,* Oliva Valenzuela A*

RESUMEN

Objetivo. Comparar la efectividad de la detección de *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* con la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (H/E) vs la técnica de ameba en fresco (AF), en niños con enfermedad diarreica aguda (EDA).

Material y métodos. Se analizaron muestras de evacuaciones de 137 niños con EDA. Se hizo la búsqueda en fresco de la *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* y simultáneamente se buscó el parásito mediante la técnica de tinción con H/E. Se relacionó la sospecha clínica de amebiasis con el resultado obtenido por las técnicas de laboratorio.

Resultados. Con el método de tinción de H/E se encontraron trofozoítos de ameba en 35 de los 137 sujetos mientras con la técnica de AF sólo en 5 casos ($p > 0.001$). Hubo la sospecha clínica de amebiasis en 52 y en 29 casos se pudo comprobar la presencia de eritrofagocitosis. Con la técnica de H/E la presunción de portadores del parásito *E. histolytica*/E. *dispar* fue más alta ($p < 0.001$), mientras que con la AF la sospecha fue positiva en 4 de los 52 casos.

Conclusiones: La técnica de tinción con H/E en frotis fue más efectiva en la observación de trofozoítos con eritrofagocitosis.

Palabras clave: Amebiasis, diagnóstico de amebiasis, tinción hematoxilina-eosina, eritrofagocitosis.

SUMMARY

Objective. To compare the effectiveness of stain technique using the dyes hematoxylin and eosine (H/E) for the identification of *Entamoeba histolytica*/E. *dispar*, with the well known, direct observation technique of fresh stool sample (FSS) taken in children with acute diarrhea (AD).

Material and methods. The samples of stool of 137 children with diarrhea were prepared in a smear with a drops of lugol solution. The microscopy observation of the feces was done in fresh samples of stools, before 30 minutes. Simultaneously amoeba was looked in fresh stools by the stain technique with H/E. The positive cases were related according to the clinical presumption of amebiasis.

Results. With the stain technique H/E were found positives 35 smears obtained in 137 children. Using the other technique only 5 cases were positives ($p < 0.001$) in the same children. There was a clinical presumption of amebiasis in 52 children, in 29 of them it was observed the presence of erithrophagocytosis in the smear study.

Conclusions. The stain contrast technique of feces, using H/E, show high effectiveness in order to observed the *Entamoeba histolytica* erithrophagocytosis.

Key words: Amebiasis, amebiasis diagnosis, hematoxylin-eosine stain, erithrophagocytosis.

La amebiasis intestinal es una infección causada por la *Entamoeba histolytica*/E. *dispar*, exclusiva del humano. En la década pasada la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que es la segunda parasitosis más importante por su frecuencia en el mundo, sólo después del paludis-

mo. La técnica para la identificación de la ameba en fresco (AF), como una forma rápida para reconocer la presencia de trofozoítos en pacientes con enfermedad diarreica aguda, se ha recomendado desde hace varias décadas para afirmar el diagnóstico clínico de amebiasis intestinal.^{1,2} Sin embargo, hay con frecuencia dificultad para discriminar entre esta *Entamoeba* y otras no patógenas (*Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *E. hartmanni*, *Iodamoeba bütschlii*), si no se tiene la experiencia suficiente para re-

* Hospital Infantil del Estado de Sonora.

** Hospital de Ginecología y Pediatría del IMSS, Hermosillo, Son.

conocerlas al microscopio de luz y es morfológicamente indistinguible de la *Entamoeba dispar*.³⁻⁵

El propósito de este estudio fue explorar la posibilidad de que la tinción con hematoxilina y eosina (H/E) en un frotis de materia fecal pudiera ser una alternativa más segura y eficaz que la técnica de "amiba en fresco", pues es posible observar con mayor claridad la eritrofagocitosis de la amiba, siendo ésta una característica propia de la *Entamoeba histolytica*.^{6,7} En este informe se compara la efectividad en la detección de la *E. histolytica*/E. *dispar* por AF vs la técnica de H/E, relacionando ambas técnicas con respecto a la impresión clínica y la presencia de sangre en evacuaciones con la técnica de tinción con hematoxilina-eosina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron las muestras de evacuaciones obtenidas en 137 niños con enfermedad diarreica aguda (EDA); todos ingresaron, para observación, al Servicio de Urgencias del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) entre el 1 de enero de 2003 al 31 de enero de 2004. Las muestras se obtuvieron con la técnica "del pañal invertido" o mediante la estimulación rectal con un hisopo, depositando la muestra de heces en un frasco de boca ancha. Fueron incluidos para el estudio los niños cuya EDA tenía una evolución menor de 7 días, entre 1 mes y 18 años de edad y que requirieron ser observados en el servicio de urgencias. Se excluyeron a todos los enfermos con diarrea de larga evolución, los que fueron transferidos a otro centro hospitalario, los que tuvieron antígenos para rotavirus en heces (rotazime positivo), aquéllos con diarrea osmótica y los que tuvieran una enfermedad agregada.

Tan pronto se obtenían en ellos las muestras de heces, se hacía la búsqueda de *E. histolytica*/E. *dispar* por la técnica de amiba en fresco, en los primeros 30 minutos. Ésta se hizo en el laboratorio clínico del hospital, de la siguiente manera: se colocó la muestra de heces en la parte central de un portaobjetos, en el extremo izquierdo se colocó una solución salina y en la derecha lugol. Luego se homogeneizaron en la laminilla, primero la solución salina y luego el lugol y se colocó el cubreobjetos. La observación se consideró positiva cuando se identificó el o los trofozoítos con eritrofagocitosis, motilidad continua, presencia de pseudópodos, y movimiento unidireccional de la ameba.

La otra fracción de la muestra de heces se envió al servicio de patología para buscar la *E. histolytica*/E. *dispar* por la técnica de tinción con H/E. Ésta consiste en: hacer un frotis de la evacuación en una laminilla fijándola en alcohol al 80% durante 5 minutos; luego se su-

merge en hematoxilina por 5 minutos y se lava la muestra en agua corriente para someterla a baño en alcohol ácido (0.5 mL de concentrado de ácido clorhídrico por cada 100 mL de alcohol), para luego lavar la laminilla y sumergirla en agua amoniacal (0.5 mL de concentrado de amoníaco por cada 100 mL de agua destilada), se lava y se sumerge en eosina por 5 minutos, se deshidrata y se aclara con xileno y se observa al microscopio. Se consideró positiva cuando se observaron trofozoítos con eritrofagocitosis, el núcleo de ellos en la periferia y con el cariosoma central.

En la técnica de amiba en fresco, la variable de desenlace fue la presencia de trofozoítos mientras que en el de la tinción la presencia de la amiba; como fracaso en ambas, fue la ausencia de éstas. Los resultados obtenidos con ambas pruebas fueron relacionados con la sospecha clínica de amebiasis. Se consideró como sospecha clínica positiva, cuando los pacientes manifestaron tener dolor abdominal, tipo cólico, acompañado de pujo y tenesmo, y se observó disminución del tono del esfínter del ano y la presencia de evacuaciones con moco y sangre. Como sospecha clínica negativa se consideró la presencia de evacuaciones diarreicas sin las manifestaciones señaladas antes. Los datos fueron analizados por Ji cuadrada y la prueba de Fisher, mediante el programa EPI info 6.

RESULTADOS

Se encontraron trofozoítos de amiba en 35 de los 137 casos con el método de tinción de H/E y sólo en 5 de las mismas 137 muestras de heces; las diferencias en la frecuencia con la que fue posible observar los trofozoítos fue significativamente mayor con la tinción H/E [$\chi^2 = 26.2$, $p < 0.0001$]. (Cuadro 1).

Al examinar la correlación de sospecha clínica de amebiasis y la prueba positiva, se encontró que la sospecha clínica en aquellos niños con sangre en las heces, la técnica con H/E mostró que en 29 de 52 pacientes fue positiva para la presencia de trofozoítos y eritrofagocitosis [$\chi^2 = 40.2$, $p < 0.0001$]. Mientras que la sospecha clínica pudo ser probada con la prueba de amiba en fresco, en sólo 4 de las 52 muestras de heces, sin significación estadística [Fisher: $p = 0.068$] (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Se sabe que el diagnóstico presuntivo de amebiasis es clínico, sólo se confirma mediante la observación de la endamoeba en las heces. La técnica ampliamente usada en los servicios hospitalarios de urgencia desde hace décadas, es la observación de la amiba en fresco.⁸ Ésta se

Cuadro 1. Observación de *Entamoeba histolytica* en las muestras de heces según se haya usado la técnica de amiba en fresco o de hematoxilina y eosina.

Técnica	Trofozoítos negativos	Trofozoítos positivos	χ^2	p
H/E	102	35	26.2	< 0.001
AF	132	5		

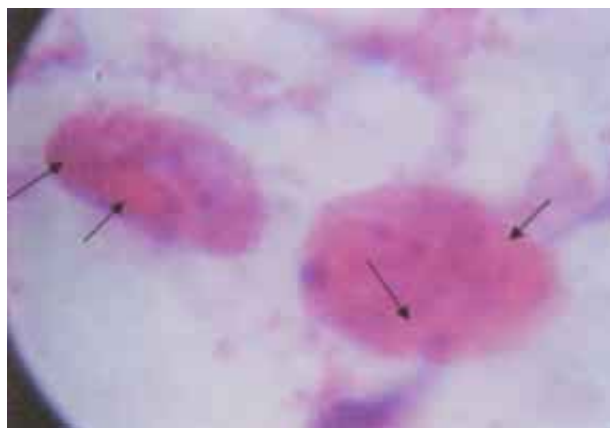
Cuadro 2. Sospecha clínica de amebiasis, por presencia de sangre y los resultados obtenidos por la técnica de búsqueda de amiba en fresco y la tinción de heces con hematoxilina-eosina.

	Hematoxilina-eosina		Amiba en fresco		Fisher p
	Sangre en heces	Positivo χ^2	Negativo	Positivo	
Con	29	40.2*	23	4	48
Sin	6		79	1	84
Total	35		102	5	132

*P < 0.0001

recomienda por la rapidez con que se obtiene el resultado, pero algunas limitaciones: puede confundir amibas patógenas con las no patógenas cuando no se observa eritrofagocitosis; por otro lado, no es posible distinguir entre amibas morfológicamente idénticas que no son patógenas, como es el caso de *E. dispar*.^{9,10}

Por eso, visualizar en un microscopio convencional los trofozoítos en su estado natural por la técnica de amiba en fresco, ésta ha sido ampliamente recomendada. En este estudio fue posible el diagnóstico de amebiasis en mayor número de casos mediante la técnica de tinción con hematoxilina-eosina: la diferencia entre los casos diagnosticados con esta técnica (35 casos) fue altamente significativa ($p < 0.0001$) con respecto a los casos diagnosticados por la técnica de amiba en fresco (5 casos). Mediante este método, de manera práctica y técnicamente simple, es posible reconocer la patogenicidad de la endamoeba, al visualizar el núcleo y el citoplasma de este protozooario y los eritrocitos que ha fagocitado; los colorantes orgánicos selectivos, como en la técnica de H/E empleada en este estudio, permiten reconocer que la amiba es patógena. Usando esta técnica la hematoxilina tiñe de color rosado el citoplasma del trofozoíto, resaltando así los eritrocitos que ha fagocitado; por su parte, la eosina resalta de el núcleo del parásito al colorearlo de azul (Figura 1). Aun cuando esta técnica sea efectiva, es conveniente mencionar que, independientemente de la técnica que se use, la identificación de la

**Figura 1.** Tinción con la técnica de hematoxilina/eosina. Las flechas señalan eritrocitos fagocitados, algunos hemolizados por la digestión intracelular.

amiba, sus estructuras y los eritrocitos fagocitados precisan que el personal haya sido capacitado para reconocer a la *E. histolytica* y diferenciarla de macrófagos o leucocitos con eritrocitos fagocitados.^{10,11} Lo que se tuvo muy presente entre quienes hicieron las observaciones en este estudio.

En cuanto al diagnóstico clínico de amebiasis: a partir de la sintomatología y particularmente por la presencia de sangre, permitió sospechar, con una mayor probabilidad, que 52 niños tenían amiba; de éstos, 29 de los 52 casos con sangre en las heces fueron positivos con la tinción de H/E [$\chi^2 = 40.2$, $p < 0.0001$], en tanto que sólo 4 de los 52 lo fueron con la técnica de amiba en fresco [$p = 0.068$]. Cabe mencionar que en los casos con sangre en las heces tuvieron como característica común la presencia de moco abundante y tener una evolución menor de 24 horas con diarrea.

Aun cuando es del dominio general que existen dos especies de amibas morfológicamente semejantes: una la *E. histolytica* y la otra, la *E. dispar*, sólo pueden diferenciarse una de la otra por pruebas inmunoquímicas y estudios genéticos, que en la práctica son de difícil acceso a la mayoría de los hospitales de segundo nivel.¹²⁻¹⁵ Por esta razón la técnica de tinción con H/E es una alternativa recomendable, por su proceso rápido y de bajo costo, que puede ser de gran ayuda para confirmar el diagnóstico y dar el tratamiento precozmente.

La detección de trofozoítos con la técnica de la AF, como en otros estudios,¹⁶⁻¹⁸ mostró con mayor frecuencia resultados negativos y rara vez pudo observarse la presencia de los trofozoítos y material purulento: de los 52 casos con sospecha clínica, únicamente en 4 casos se reportaron resultados positivos y en un caso sin sangre en las heces se identificaron trofozoítos. Es pertinente hacer

mencción que 6 niños sin sangre en las heces fueron positivos por la presencia de amiba en las heces. Así, el empleo de la H/E para identificar trofozoítos posiblemente evitará la tendencia a sobrediagnosticar la amebiasis con criterio clínico, sin tener ninguna base que apoye o que oriente el diagnóstico al de una infección sintomática invasora. Lo ideal sería contar con un apoyo de laboratorio, aparte de la AF, que permita, ante la sospecha clínica, relacionar la patogenicidad de la amiba mediante la observación de un frotis, pues existen otros agentes biológicos a los que se asocia la presencia de moco y sangre en las evacuaciones, en ocasiones acompañados de pujo y tenesmo y en otras con prolapso rectal.

Será deseable que en futuras investigaciones se valore la sensibilidad y la especificidad del método de H/E tomando como estándar de oro la identificación de la amiba por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la técnica de ELISA. Cabe, pues, concluir que la técnica de tinción con H/E en un frotis de heces frescas permitió observar la eritrofagocitosis de trofozoítos de amiba, comprobando el diagnóstico clínico de amebiasis en mayor número de niños; la confirmación del diagnóstico fue significativamente menor con la técnica de amiba en fresco. Por otra parte la técnica de H/E permitió identificar un mayor número de niños con amiba y la presencia de sangre en las heces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los técnicos patólogos: Sofía López V. y Silvia Carvajal M. por su valiosa colaboración, y a los doctores: Guillermo López Cervantes, Manuel A. Cano Rangel y Roberto García Hernández, por sus comentarios y sugerencias en este trabajo.

Referencias

1. *Harrison principios de medicina Interna*. 14ª edición. España; McGraw- Hill Interamericana, 1998; 1342, 1347-1351.
2. Omar MS, Awad ME, al-Madani AA. Giardiasis and amoebiasis infections in three Saudi closed communities. *J Trop Med Hyg* 1991; 94: 57-60.

3. Furst C, Gomes MA, Tafuri WL, Silva EF. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Furst C- Pathologica* 2002; 94(1): 22-7.
4. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 228-237.
5. Nesbitt RA. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Natl Med Assoc*. 2004; 96(5): 671-7.
6. Procop GW. Gastrointestinal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1073-108.
7. Reyes L, León R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amebiasis intestinal. *Rev Costarric Cienc Méd* 2002; 23: 161-173.
8. Healy GH, Ravdin JT. Diagnostic techniques for stool samples. In: *Amebiasis: human infection by E. histolytica*. New York: J Wiley & Sons, 1988: 635-649.
9. Jong E. Intestinal parasites. *Prim Care* 2002; 29(4): 857-877.
10. Gonin P. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 237-41.
11. Stanley SL Jr. Review Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology* 2001; 17: 280-285.
12. Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 58-70.
13. Cox FEG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 595-612.
14. Petri Jr WA, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1117-25.
15. Haque R, Mollah NU, Ali IKM et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 32-35.
16. Bernal-Sánchez G, Rebollo-Vargas FJ. Estado actual de la amebiasis. *Cir Ciruj* 1997; 65(5): 151-156.
17. Abd Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Inthealth* 2002; 7: 366-370.
18. Bruckner DA. Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 1992: 356-369.

Correspondencia:
Dr. Norberto Gómez Rivera
Servicio de Urgencias
Hospital Infantil de Sonora
Reforma Final No. 355 Norte
CP 83000 Hermosillo, Sonora.

