



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-
ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN
PACIENTES CON PRUEBAS HEPATICAS
ALTERADAS.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

TESISTAS: Francisco Riquelme Cáceres
Romina Uribe Miranda
PROFESOR GUIA: TM. MgCs. Sylvia Vidal Flores

TALCA, NOVIEMBRE 2004

*"A mi gran amigo y padre querido, Patricio Uribe
Castillo, que es lo que más amo en este mundo, sin él
nada de esto sería posible, sin su incondicional apoyo,
preocupación y consejos constantes, la vida me hizo muy
afortunada de tenerlo como padre"*

*Porque te quiero a ti
porque te quiero,
cerré mi puerta una
mañana
y eché a andar...*

Joan Manuel Serrat

"Agradezco a la Sra. María Isabel Yercic, jefa de parasitología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) por su colaboración en la estandarización de nuestra técnica con la donación de sueros controles.

A José Vasquez Mendez, compañero y gran amigo mío, que en cierta medida se vio involucrado en nuestro proyecto.

A nuestra querida y respetada profesora Sylvia Vidal, por creer y apoyarnos en todas nuestras decisiones.

A mi mamá, a mi mami mina que las amo mucho, a mis grandes amigos, sobretodo a la Ale soto, y a todos esos momentos inolvidables que viví en la universidad.

A mi compañero de vida Carlos Rivera Hernández, por su apoyo en esta labor, te amo muchísimo.

Y a Mr. Satán (Ruleins) por permitir unirme a este proyecto, y porque fue un placer trabajar con él.

Romina

"Agradezco al Laboratorio clínico del Hospital Regional de Talca y en especial a la Sra. María Teresa Vélez y Oriana Rodríguez, por su colaboración en la recolección de muestras y facilitación del laboratorio.

A la profesora Sylvia Vidal por la confianza depositada en sus alumnos y por todo el apoyo entregado.

A mis padres y hermano que me brindaron su apoyo en todos los momentos y me dieron la oportunidad de estudiar, a mis abuelos, tíos y primos por su gran preocupación y cariño.

A mis amigos chochi y los 3 de siempre 4° F 1997 (kike, chulo y negro) que compartimos grandes momentos en todos estos años de colegio y universidad, terminando ahora juntos como buenos colegas.

A mi dulce historia de amor Ana Mary, que en su fortaleza encontré un gran descanso.

Y a la Romi, el placer fue mío.

Francisco

INDICE

	Paginas
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	5
4. Entamoeba histolytica	6
4.1 Descripción	6
4.2 Taxonomía	6
4.3 Historia	6
4.4 Morfología.	9
4.4.1 Trofozoíto	9
4.4.2 Quiste	10
4.5 Epidemiología	12
4.5.1 Epidemiología en Chile	13
4.6 Ciclo de vida	13
4.7 Virulencia	15
4.8 Respuesta inmune en la amebiasis	17
4.8.1 Inmunidad humoral	17
4.8.2 Inmunidad celular	17
4.9 Cuadro clínico	18
4.9.1 Amebiasis	18
4.9.2 Amebiasis intestinal	18
4.9.3 Absceso hepático amebiano (AHA)	20
4.9.4 Amebiasis pleuropulmonar	21
4.9.5 Amebiasis cutánea y mucosa	21
4.9.6 Absceso cerebral amebiano	21
4.10 Histopatología de algunos tipos de amebiasis	22
4.11 Diagnostico	24
4.11.1 Amebiasis intestinal	25
4.11.2 Amebiasis hepática (AH)	25
4.11.3 Diagnostico diferencial	28
4.12 Tratamiento	29
5. Materiales y método	31
5.2 Muestra	31
5.1 Lugar de estudio	31
5.3 Reactivos	32
5.4 Materiales	32
5.5 Técnica	32
5.5.1 Fundamento	32
5.5.2 Estandarización de la técnica	33
5.6 Lectura.	35
5.7 Interpretación.	35

6. Resultados	36
7. Discusión	42
8. Bibliografía	44

1. RESUMEN

La amebiasis se define como la condición de portar *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas.

En el presente estudio se determinaron anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el kit de bioMérieux Amoeba-Spot IF en 78 sueros obtenidos del laboratorio clínico del Hospital Regional de Talca.

Estas muestras fueron seleccionadas de acuerdo a la alteración en sus pruebas hepáticas, ya sea transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina total e indirecta. Se excluyeron aquellas muestras que presentaron pruebas hepáticas alteradas debido a serología positiva para VIH, diagnóstico de cualquier tipo de cáncer y terapia con algún antibiótico.

Las 78 muestras obtenidas fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de parasitología de la Universidad de Talca, y la determinación se realizó en microscopio de epifluorescencia de este laboratorio. En la selección de las muestras se descartaron aquellas que presentaron hemólisis marcada e hiperlipidemia evidente, de acuerdo a esto se seleccionaron 78 muestras de un total de 112 muestras recolectadas para la determinación de anticuerpos.

Previo a la determinación de anticuerpos en estos sueros, se estandarizó la técnica utilizando un control positivo que se obtuvo del Instituto de salud Pública de Chile (ISP). Se realizaron una serie de diluciones tanto del suero control, como del conjugado, para posteriormente utilizar como dilución del suero 1:200 y del conjugado 1:60, y de acuerdo a esto se trabajaron las muestras.

De las 78 muestras analizadas sólo una presentó anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica*, observándose una intensidad de la fluorescencia de 2+. Posteriormente se realizó el título del suero, que dio como resultado un título de 1:256. Sólo se titularon las muestras positivas.

2. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define a la amebiasis: “como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas”.

La amebiasis es una enfermedad producida por *Entamoeba histolytica* de distribución normal. Se estima que afecta alrededor de 500 millones de personas anualmente y que de ellos 110.000 mueren por complicaciones causadas por este agente.

Entamoeba histolytica es un protozoo perteneciente a la subfamilia *Sarcodina* y a la familia *Entamoebidae*. Existen varias especies que infectan al hombre, siendo *E. dispar* la que causa una patología sistémica de mayor gravedad. El ciclo de este parásito implica la existencia de portadores asintomáticos, que eliminan por sus heces quistes con capacidad de sobrevivir bajo ciertas condiciones ambientales y que pueden infectar por vía digestiva a otras personas. La infección no induce una inmunidad protectora duradera.

El agente etiológico de entamoebosis-amebiasis, *E. histolytica* fue descrito por Rösel van Rosenhof desde los primeros microscopistas del siglo XVII y XVIII, siendo Lösch quien describió la enfermedad de disentería amebiana en 1875 en San Petersburgo, Rusia. El nombre de *E. histolytica* le fue asignado por Schaudin en 1903 por su capacidad de lisis de tejido y producir úlceras intestinales. La especie *Entamoeba histolytica* fue propuesta por Brumpt en 1925.

A partir de los años 90, datos bioquímicos, genéticos, inmunológicos, clínicos y epidemiológicos confirman la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*, la primera ocasiona enfermedad invasora intestinal y extraintestinal y la segunda no es capaz de cruzar la mucosa intestinal y tiene solo una acción luminal (1).

Los estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de la infección por *E. histolytica* no son concluyentes y suelen presentar dificultades de interpretación debido, fundamentalmente, a tres factores. Primero, al reducido número de sujetos infectados en los que se observa el microorganismo en un examen único de heces. En segundo lugar, a la confusión con otras especies amebianas a partir de la simple observación de los quistes

fecales y, por último, a la variabilidad de la detección de anticuerpos antiamebianos en el suero después de la infección (2).

En determinadas zonas de África, Asia y Centroamérica la frecuencia de la infección alcanza al 50% de la población, hecho relacionado con las deficientes condiciones sanitarias, el hacinamiento y el bajo nivel socioeconómico. En la inmensa mayoría de los casos, la infección intestinal es asintomática (1-2).

En general se considera que 90% de los individuos infectados son asintomáticos, 10% desarrolla amebiasis intestinal invasora y sólo 1% de los casos se convierte en amebiasis extraintestinal.

Los cuadros clínicos de la entamoebosis-amebiasis intestinal son: infección asintomática, infección sintomática no invasora e invasora con lesiones y úlceras en la mucosa; la forma grave evoluciona a diarrea con moco, sangre y fiebre. El diagnóstico clínico se establece con base en síntomas gastrointestinales como: diarrea, dolor cólico abdominal, tenesmo, pujo y cefalea; éste es considerado relativamente fácil y es del dominio del médico general, sólo en pocas ocasiones se recurre al especialista. La tendencia del médico a establecer el diagnóstico exclusivamente con criterio clínico favorece el sobre-diagnóstico (1-2).

Algo semejante sucede con el diagnóstico etiológico, el cual no en todos los casos se realiza porque se tiene la dificultad de practicar exámenes de laboratorio específicos. El diagnóstico parasitológico con exactitud y precisión se desempeña en los centros de salud de tercer nivel y disminuye su calidad en el segundo y primer nivel hasta convertirse en resultados con poca confiabilidad. La identificación del agente causal se lleva a cabo mediante el examen Parasitológico Seriado de Deposiciones (PSD) directos y de concentración por flotación, técnicas que se encuentran montadas en todos los laboratorios del país, que son de fácil ejecución y bajo costo; en donde lo más valioso resulta la acuciosidad y experiencia del Tecnólogo Médico.

En cuanto a la amebiasis extraintestinal, la más común corresponde al absceso hepático amebiano (AHA) la cual se debe a la presencia de grandes cantidades de amebas en el hígado, las que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente inducen una pobre respuesta inmune celular. El diagnóstico de esta

patología debe hacerse con una biopsia, aunque actualmente se utilizan métodos no invasivos como TAC, acompañados de diagnóstico serológico utilizando técnicas como ELISA, hemoaglutinación indirecta e Inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica que se utilizará en este estudio. Se ha demostrado que los anticuerpos antiamebianos se encuentran en un 80% de los pacientes con amebiasis extraintestinal (3).

La amebiasis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años, y se asocia con una alta mortalidad (4).

3. OBJETIVOS

Objetivo General.

- Detectar serologicamente mediante IFI anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* en pacientes con pruebas hepáticas alteradas provenientes del laboratorio clínico del Hospital Regional de Talca.

Objetivos Específicos.

- Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia para la identificación de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* mediante Amoeba-spot-IF, bioMérieux en el laboratorio de parasitología de la Universidad de Talca.
- Identificar en los pacientes estudiados su correlación con el absceso hepático.
- Determinar la prevalencia de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* a partir de los datos obtenidos en la población a estudiar.
- La detección inmunológica de los anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* con Amoeba-Spot IF es una ayuda en el diagnóstico de la amebiasis.

4. ENTAMOEBA HISTOLYTICA

4.1 Descripción.

E. histolytica/*E. dispar*, comparte con otras amebas comensales del tubo digestivo su ubicación. Las diferencias morfométricas son utilizadas para la identificación microscópica de trofozoítos y quistes, y en manos de un laboratorista no muy versado en microscopía puede fácilmente confundirse con *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bustschlii* y con el flagelado *Dientamoeba fragilis* (1).

Se pueden diferenciar tres formas de *Entamoeba histolytica*: el trofozoíto, el prequiste (el que generalmente posee 2 núcleos) y el quiste que posee 4 núcleos.

4.2 Taxonomía.

La *Entamoeba histolytica* es uno de los eucariontes más primitivos pertenecen al reino Protista y sub-reino *Protozoa*, familia *Entamoebidae* del orden Amoebida, subfilo Sarcodina, superclase Rhizopoda de protozoos formadores de pseudópodos, de la clase Lobosea (30).

4.3 Historia.

Entamoeba histolytica fue reconocida por Lösch en un paciente con disentería en 1875; sin embargo, el autor no estableció la relación causa-efecto entre la ameba y los síntomas del paciente. El nombre de la especie fue introducido más tarde por Schaudin en 1903. Desde entonces, la relación hospedador-parásito ha sido motivo de controversias y gran confusión por la notoria discrepancia entre el número de individuos infectados y la baja frecuencia de la enfermedad, la cual afecta a un 10% de los parasitados (6).

En la búsqueda de una explicación plausible para tal disparidad se plantearon tres hipótesis: Dobell consideró que *E. histolytica* era un parásito tisular obligatorio y que la

enfermedad ocurría cuando se rompía el equilibrio entre el paciente y la ameba. Kuenen y Swellengrebel consideraron al protozoo como un comensal que, bajo la influencia de ciertos estímulos, invadía los tejidos.

Por último, Brumpt en 1925 propuso el concepto de que *E. histolytica* comprendía dos especies morfológicamente idénticas, una no patógena y otra patógena responsable de la amebiasis invasiva, pero que era posible la existencia de portadores asintomáticos; propuso el nombre de *E. dispar* para la primera y *E. dysenteriae* para la segunda. Este concepto no fue ampliamente aceptado y *E. dispar* pasó al anonimato, como sinónimo de *E. histolytica*, durante más de medio siglo cuando se empezaron a acumular evidencias de que Brumpt estaba en lo cierto.

En 1978, Sargeant empezó a analizar el patrón electroforético de las isoenzimas de la hexoquinasa de *E. histolytica*, estableciendo su gran valor para el estudio de la relación hospedador-parásito. Logró determinar dos tipos de patrones electroforéticos, los cuales denominó “zimodemas patógenos” y “zimodemas no patógenos”. El autor, en conjunto con otros investigadores de Estados Unidos, México, Europa, Israel, India, Japón y Sur África, estudió la distribución mundial de los zimodemas del parásito en alrededor de 10.000 casos de amebiasis. Todos los pacientes con amebiasis invasiva estaban infectados con amebas que presentaban zimodemas patógenos y aquellos con infecciones asintomáticas tenían zimodemas patógenos y no patógenos.

Estos hallazgos condujeron a Sargeant a postular en 1982 que en la amebiasis estaban involucradas dos especies, una patógena y otra no patógena, y que la propuesta de Brumpt debía ser aceptada.

Un grupo de investigadores de Sur África se dedicó a estudiar la relación hospedador-parásito comparando los hallazgos de zimodemas patógenos y no patógenos con los hallazgos clínicos, epidemiológicos y serológicos. En individuos con amebiasis asintomática demostraron que el 1% albergaba *E. histolytica* y el 9% *E. dispar* y en pacientes con amebiasis sintomática o invasiva demostraron que la respuesta serológica se asocia a los zimodemas patógenos, pero no a los no patógenos (6).

Estos estudios y los de Sargeant permitieron llegar a la conclusión de que la ameba clásicamente conocida como *E. histolytica* en realidad comprende dos especies

morfológicamente idénticas: *E. histolytica* responsable de la enfermedad y *E. dispar* que es un comensal intestinal. La infección con la primera puede ser asintomática y desaparecer espontáneamente o hacerse invasiva y producir la enfermedad. Estudios genéticos recientes han demostrado una divergencia genómica entre las dos amebas (7), hallazgo que constituye una evidencia irrefutable de la existencia de dos especies diferenciables por métodos bioquímicos, inmunológicos y genéticos. Esta redefinición de la clásica *E. histolytica* revoluciona el conocimiento que se tenía de la relación hospedador-parásito, epidemiología y métodos óptimos de diagnóstico de esta ameba. Sin embargo, aún cuando esclarece la causa de la falta de correlación entre el número de infectados y el número de enfermos, no resuelve la incógnita de cuales son los factores que inducen a este parásito a invadir los tejidos.

La aceptación de la especie *E. dispar* cambia drásticamente la epidemiología de la amebiasis. Se tenía el concepto que el 10% de la población mundial está infectada con *E. histolytica*, que solamente el 10% de los parasitados desarrolla la enfermedad y que 500 millones de personas en el mundo se infectan anualmente (2). A la luz de la existencia de dos especies dentro de lo que clásicamente se conocía como *E. histolytica*, se puede estimar que el 90% de estos individuos están parasitados por *E. dispar* y sólo el 10% alberga *E. histolytica* y de estos últimos uno de cada diez desarrolla la enfermedad. El número de individuos infectados se reduciría a 50 millones por año, de los cuales 5 millones (10%) enfermarían.

A partir de 1993, datos bioquímicos, genéticos, inmunológicos, clínicos y epidemiológicos confirman la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Hasta 1996 la identificación de trofozoítos y quistes de *E. histolytica* se realizaba exclusivamente mediante la observación microscópica, pero ésta no permite establecer diferencias morfológicas entre las dos especies. Las técnicas de laboratorio que hacen posible esta diferenciación son el análisis de isoenzimas (zimodemas), la captura de antígeno en heces, reacción de polimerasa en cadena (PCR) para la amplificación de la pequeña subunidad de RNA ribosomal y cultivo axénico, las cuales se realizan en laboratorios de referencia de cada país (1-22-25).

4.4 Morfología.

4.4.1 Trofozoíto.

Es un anaerobio facultativo de 10-40 μ de diámetro, 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, se diferencia de los procariontes por tener un núcleo organizado, genoma complejo y superficie constituida por una sola membrana plasmática. Su tamaño es apenas 4 a 5 veces mayor que un glóbulo rojo (7-8).



Figura 1. Trofozoíto: vista microscópica.

La aparente simplicidad estructural citoplasmática de las amebas hace que el sólido conocimiento sobre la biología celular sea casi inutilizable para la comprensión biológica del parásito; los componentes amebianos aislados se degradan por sus proteasas; la fragilidad de las amebas limita de forma sensible su manipulación y, finalmente, los cultivos son muy susceptibles a variaciones en sus componentes.

Visto al microscopio electrónico de transmisión, el citoplasma de los trofozoítos es hialino, aparece como un conjunto de vacuolas dispuestas en una matriz granular. En amebas obtenidas en casos de disentería, muchas de esas vacuolas contienen glóbulos rojos; en las amebas provenientes de cultivos mixtos se encuentran llenas de almidón o de fragmentos de bacterias.

La movilidad de los componentes citoplasmáticos de la ameba, su desplazamiento relativamente rápido sobre el substrato, la explosiva formación de pseudópodos y la voraz capacidad de ingerir partículas y células de todo tipo que se encuentren en su camino, constituyen los atributos más llamativos de las amebas patógenas. Posee pseudópodos digitiformes.

Durante la división nuclear aparecen los microtúbulos, únicos componentes bien definidos en la fase de la multiplicación celular. Se ha descrito el núcleo como “forma de carreta”.

Los trofozoítos se multiplican en la luz intestinal por división binaria y se enquistan, produciendo a su vez quistes cuadrinucleados (8-27).

4.4.2 Quiste.

Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μ de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente.

Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y nucléolos en número de uno a cuatro, su citoplasma además posee vacuolas de glicógeno (13).

Los quistes son una forma de resistencia de la *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo.

El proceso de enquistamiento de la ameba se da cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoítos.

Aún hoy, dicho evento dista mucho de ser entendido cabalmente por la incapacidad de reproducir el fenómeno para la *E. histolytica in vitro*, sin embargo, se ha podido confirmar un papel importante de la quitina (polímero de N-acetilglucosamina unida por

enlaces α (1-4), muy común en hongos, crustáceos e insectos pero ausente en humanos) en la transformación *in vitro* del trofozoíto de *E. invadens* a quiste. Esto pudo comprobarse con inhibidores específicos de quitina los que disminuyeron notablemente el número de quistes formados en cultivo (8-9-27).

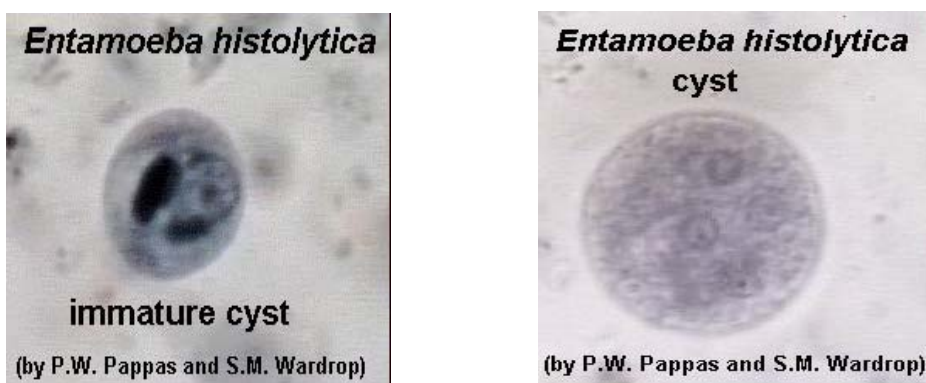


Figura 2. Quistes de *Entamoeba histolytica*.

Como se puede apreciar en la figura 2 los quistes de *Entamoeba histolytica* son redondos, posee una membrana bilaminar, con la presencia de 4 núcleos.

El quiste puede o no presentar el cuerpo cromatoidal, (con forma de puro), el que se encuentra en el citoplasma. Cada núcleo tiene un nucleolo el cual es puntiforme y central. Se diferencia de la *Entamoeba coli*, la cual puede tener 4 a 8 núcleos, incluso más, en la ubicación y forma del nucleolo.

Entamoeba coli presenta una cromatina del cariosoma excéntrica y su cromatina periférica es irregular, a diferencia de la de *E. histolytica*.

Los prequistes (1 a 2 núcleos), por mitosis forman el quiste maduro de 4 núcleos, el cual se elimina por la deposición formada, no en las diarreas, las cuales eliminan predominantemente trofozoítos.

Estudios han demostrado que el genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño alrededor de 18-20 Mb y está partido en 14 cromosomas. Estos estudios son bastante nuevos, y no

están acabados, han sido realizados por el instituto de Sanger con la colaboración de la escuela de Londres de la higiene y de la medicina tropical más el Instituto de Investigación del Genoma (8-12).

4.5 Epidemiología.

La infección con *E. histolytica* tiene una distribución universal y genera una enfermedad cosmopolita. Junto con *Giardia lamblia*, son las infecciones parasitarias preponderantes en Estados Unidos. La amebiasis es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y de excretas, de ahí que sea más frecuente la infección y la enfermedad. De hecho se ha escrito que afecta al 10 a 20 por ciento de la población mundial y alcanza prevalencias de 30 y hasta 55 por ciento en regiones tropicales y subtropicales mal saneadas.

En Colombia y Brasil se calculan prevalencias de hasta 40 por ciento, y en Costa Rica de 27 a 55 por ciento, posiblemente relacionadas también con altas prevalencias de desnutrición.

En otras regiones del tercer mundo se han reportado prevalencias de entre 3.2% en Bangladesh hasta 30% en Arabia (4-10).

En forma general, la aceptación de la especie *E. dispar* dado por los estudios de Sargeant cambia drásticamente la epidemiología de la amebiasis. Se tenía el concepto que el 10% de la población mundial está infectada con *E. histolytica*, que solamente el 10% de los parasitados desarrollan la enfermedad y que 500 millones de personas en el mundo se infectan anualmente (2-22-27).

A la luz de la existencia de dos especies dentro de lo que clásicamente se conocía como *E. histolytica*, se puede estimar que el 90% de estos individuos están parasitados por *E. dispar* y sólo el 10% alberga *E. histolytica* y de estos últimos uno de cada diez desarrolla la enfermedad. El número de individuos infectados se reduciría a 50 millones por año, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25 % (entre 40 y 110 mil muertes), siendo a nivel mundial la tercera parasitosis causante de muerte (4-10).

La amebiasis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años, y se asocia con una alta mortalidad (4-27).

Está universalmente aceptado que el hecho de habitar en zonas endémicas es un factor que condiciona un elevado riesgo de infección. En los casos de viajeros o residentes temporales en estas zonas, su adquisición se asocia por lo general con una permanencia superior a un mes, aunque la frecuencia puede estar subestimada ya que suele detectarse únicamente cuando se producen síntomas en el viajero. Otro grupo de alto riesgo son los homosexuales, debido a la transmisión de quistes por medio de sexo oral-fecal (13).

4.5.1 Epidemiología en Chile.

En nuestro país existen datos sobre la frecuencia de los anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* recogidos mediante estudios serológicos de Inmunofluorescencia Indirecta, el más reciente fue publicado en 1984 en la revista médica de Chile, donde se estudió la frecuencia de seropositividad para amebiasis en 932 muestras de suero provenientes de donadores de sangre adultos aparentemente sanos de diferentes ciudades de Chile tales como Arica, Iquique, Antofagasta, Copiapó, Vallenar, Illapel, Quillota, Talca, Chillán, Concepción, Coyhaique y Punta Arenas. La seropositividad total encontrada fue de 8.9% (83/932), con un rango de 1 a 22% dependiendo de la región estudiada, la mayor frecuencia se encontró en Iquique en comparación al resto del país (16).

4.6 Ciclo de vida.

El ciclo de vida es relativamente sencillo. 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. En el intestino delgado ocurre la llamada desenquistación dado por las condiciones favorables en el interior (temperatura mayor que en el exterior, pH neutro a alcalino, presión de oxígeno baja), si no fuera así los quistes se eliminan como tales.

Este proceso 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, penetran la mucosa con la ayuda de algunas enzimas, produciendo una úlcera mediana, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. La úlcera es más profunda en la capa interna del intestino.

Si pasa a la sangre, por el sistema portal infecta al hígado, provocando un absceso hepático, si llega al pulmón produce absceso pulmonar, y si llega al cerebro produce un absceso cerebral. Finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse completando el ciclo.

En la mayoría de los individuos infectados la *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (8-11-27-29).

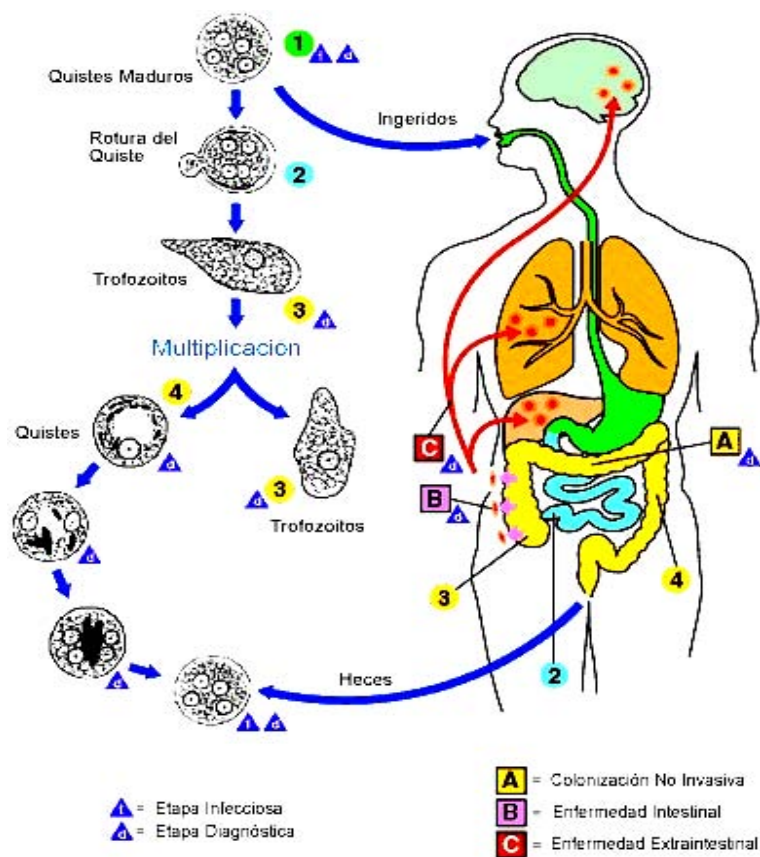


Figura 3. Ciclo de vida.

4.7 Virulencia.

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de la *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.

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 huésped. 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 zimodemas. Así, distintos zimodemas se asociaron con la enfermedad sintomática invasora (*E. histolytica*) o con el estado de portador asintomático (*E. histolytica* o *dispar*).

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 patogénicas de las no patogénicas 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 lectina inhibible por galactosa en *E. histolytica* pero no en *E. dispar*. Otra diferencia es la presencia de eritrocitos ingeridos por la *E. histolytica* lo que no sucede con la *E. dispar* (11-22).

En general la patogenia depende si la cepa es patógena, de las sustancias tóxicas que libera, ya sea enzimas o citotoxinas, de su asociación con otras bacterias, y del estado inmunológico y nutricional del huésped (la abundancia de hierro facilita la invasión) (13).

Entre la variedad de los factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*, se conoce una adhesina lectina (Gal/GalNAc) de 260 kDa la cual produce una colonización inmediata y respuestas del huésped subsecuentes. La Gal/GalNAc lectinas reconocida por ser inmunogénica juega un rol esencial en la citólisis y fagocitosis.

Esta adhesina es una proteína multifuncional, formada por heterodímeros de cadenas pesadas (170-kDa) y livianas (35/31-kDa). La adherencia de la molécula del parásito ha sido demostrada por su adhesión a eritrocitos humanos, neutrófilos, colonias de mucina, algunos epitelios y a ciertas bacterias cuando la lectina es inhibida por galactosa. Finalmente se ha descubierto una función de esta molécula, la que sugiere una disminución de los niveles de antioxidantes (depleción de los niveles de radicales libres) (15-17-26).

Otro factor descrito que se involucra en la virulencia de este parásito es la formación de un poro en la ameba misma. Se le denomina amebaporo y corresponde a un péptido que forma un canal de 77 residuos de aminoácidos, los cuales han sido purificados; la proteína ha sido ordenada, y los genes respectivos han sido reproducidos. Tres isoformas de amebaporo se han descrito, A, B, y C y están presentes en una proporción de 35:10:1, respectivamente.

Lo que mantienen en común las diferentes isoformas es un residuo de cistina en posiciones idénticas, además de un residuo de histidina cerca del extremo C terminal. *In vitro* este factor de virulencia ha demostrado tener una gran actividad lítica de células humanas (15-22).

Por medio de electroforesis en gel se han encontrado proteasas, específicamente cisteínas las cuales cumplen diferentes funciones, como destrucción de hemoglobina (hemoglobinas de 80 kDa) histolisinas de 29kDa, etc, las cuales se involucran también en este proceso.

4.8 Respuesta inmune en la amebiasis.

La evidencia de que es muy rara la recurrencia en la amebiasis invasora confirma que existe inmunidad protectora. Por otro lado se ha hecho énfasis en la relativa importancia de la inmunidad celular sobre la inmunidad humoral en la amebiasis.

4.8.1 Inmunidad humoral.

Se sabe que después del séptimo día de desarrollo de un AHA aparecen en el suero títulos elevados de anticuerpos anti-amebas, los cuales persisten hasta por diez años. El papel protector de dichos anticuerpos se pone en entredicho debido a que el AHA sigue su curso, a pesar de que como es sabido los anticuerpos anti-lectina son capaces de inhibir la adherencia de las amebas *in vitro*. Por otro lado el suero de individuos testigos e infectados (con altos títulos de anticuerpos anti-ameba) es capaz de lisar trofozoítos de cepas no virulentas *in vitro*, por activación del complemento en cualquiera de sus dos vías, clásica o alterna. Sin embargo, las cepas virulentas de *E. histolytica* son resistentes a la lisis mediada por complemento.

Existe una respuesta de IgA secretora contra la *E. histolytica* durante la amebiasis invasora como lo prueba la presencia de anticuerpos en el calostro y la saliva. No se sabe si es la infección producida por *E. dispar* o *E. histolytica* lo que induce una respuesta de IgA intestinal que sea efectiva para eliminar al parásito del intestino. No obstante, no existe evidencia de que la amebiasis intestinal ocurra con más frecuencia o sea más severa en individuos con deficiencias de IgA. Lo que sí se sabe, es que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a la IgA secretora humana, rasgo que podría interpretarse como un mecanismo de defensa del parásito a nivel de las mucosas.

4.8.2 Inmunidad celular.

Al parecer la inmunidad celular desempeña un papel protector importante en la amebiasis como lo sugieren las respuestas celulares obtenidas en modelos animales; la

depresión de estas respuestas resultó en un incremento de la invasividad y se comprobó que la protección por vacunación antes de la infección se debía a una respuesta inmune celular. Debe notarse que durante la fase aguda del AHA, puede ocurrir una depresión transitoria de: la respuesta inmune celular medida por hipersensibilidad de tipo tardío hacia ciertos antígenos amebianos, el número de linfocitos T, la producción del factor inhibidor de la migración.

En relación a los linfocitos T, se ha observado que los pacientes con AHA tienen una relación T4/T8 menor a los individuos sanos, pero una vez que se curan, los niveles de linfocitos T4 se restablecen, así como sus respuestas celulares contra la *E. histolytica in vitro* (31).

4.9 Cuadro clínico.

4.9.1 Amebiasis.

De acuerdo a los síndromes presentados por los individuos infectados, la amebiasis puede ser agrupada como: asintomática, sintomática sin evidencia de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular. Esta es una enfermedad que se relaciona con la pobreza, la ignorancia, malas condiciones sanitarias, de hacinamiento y desnutrición. La amebiasis está ampliamente distribuida en el mundo, siendo India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América, las áreas con mayor incidencia. Como ya se mencionó, se calcula en 500 millones el número de personas infectadas, de éstas sólo el 10% desarrollan la enfermedad, llegando a ser letal en el 0.1% de estos últimos (27).

4.9.2 Amebiasis intestinal.

Esta es la forma sintomática más frecuente de amebiasis, sin embargo, los síntomas de esta enfermedad son inespecíficos y de poco valor en estudios epidemiológicos.

La *E. histolytica* es capaz de multiplicarse en la luz y en la pared del intestino grueso. Cuando no hay invasión de la pared, el portador es asintomático, lo que constituye aproximadamente el 75% de los casos que presentan el parásito al examen coprológico.

Inicialmente el punto de penetración se manifiesta como una alteración microscópica de la mucosa y submucosa. Cuando las amebas se han multiplicado suficientemente se produce una lesión puntiforme que se observa como una pequeña prominencia, que es el origen de la laceración.

Los trofozoítos se multiplican en la parte más profunda de la lesión, con tendencia a destruir los tejidos de manera horizontal, por debajo de la mucosa intestinal, cuando esto ha sucedido se constituye la lesión característica llamada “botón de camisa” la cual consiste en una pápula con una pequeña laceración central que se prolonga de manera más amplia en la base.

Dos a seis semanas después de la ingestión de quistes infecciosos, se presenta una colitis amebiana sintomático. Gradualmente, aparece un dolor abdominal inferior y una ligera diarrea, que va seguido por malestar, pérdida de peso y dolor de espalda y abdominal inferior difuso.

Cuando la multiplicación de las amebas ha sido suficientemente grande para destruir una mayor cantidad de mucosa intestinal, se producen ulceraciones con fondo rugoso y abundante moco. Las ulceraciones confluyen, abarcan mayor extensión y dan origen a formas necróticas graves (8-11-21).

Menos del 10% de los casos con amebiasis intestinal invasora resulta en infecciones severas mortales como colitis amebiana ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amebiana fulminante, ameboma o granuloma amebiano y apendicitis amebiana (11).

Amebiasis intestinal invasiva aguda.

- Gran cantidad de evacuaciones, pujos y tenesmos.
- Cada vez se elimina menos materia fecal hasta ser sólo moco sanguinolento (esputo rectal).
- Sin fiebre.
- Puede complicarse y pasar a la cronicidad o curarse.

Amebiasis intestinal invasiva crónica.

- Colitis sin disentería.
- Dolor abdominal, diarrea, moco.
- Pujo y tenesmo.

Colitis amebiana fulminante.

- Fiebre alta.
- Hemorragia masiva.
- Sensibilidad abdominal.
- Se trata con colectomía y tratamiento quimioterápico intenso (13).

4.9.3 Absceso hepático amebiano (AHA)

El AHA se debe a la presencia de grandes cantidades de amebas en el hígado, las que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente inducen una pobre respuesta inmune celular. Se ignora si esto se puede generalizar para todos los casos en humanos o simplemente si se debe a que una incipiente respuesta celular ha escapado a su detección en las series de biopsias examinadas.

Utilizando modelos animales se ha podido establecer los eventos celulares que siguen a la infección por *E. histolytica*. Así sabemos que; a las pocas horas de la llegada de la *E. histolytica* a los sinusoides hepáticos, se produce una reacción inflamatoria de tipo agudo (donde predominan los leucocitos polimorfonucleares (PMN), entre ellos algunos eosinófilos y escasos mononucleares) alrededor de las amebas, notándose en la periferia de dichos infiltrados núcleos picnóticos y citoplasma eosinofílico (15).

Estas lesiones aumentan de tamaño y se van haciendo más irregulares, los PMN sufren la lisis progresiva por acción del parásito y el número de mononucleares se incrementa, los hepatocitos sufren de necrosis y las lesiones tienden a ser confluentes dando origen a granulomas que contienen en el centro material necrótico o eosinofílico.

Finalmente, después del quinto día, la coalescencia de los granulomas dan origen a zonas necróticas, el desenlace de dicho proceso generalmente es la muerte. En opinión de

algunos expertos, este aspecto microscópico no justifica el término absceso. Su incidencia es de aproximadamente el 2% de los adultos infectados con *E. histolytica* en áreas endémicas y de 4% en las epidémicas.

Las amebas pueden hacer metástasis más fácilmente del hígado que en el intestino, hacia otros órganos. El AHA es 13 veces más frecuente en hombres que en mujeres y 10 veces más frecuente en adultos que en niños; existen estudios que señalan una posible relación entre el AHA y la frecuencia de ciertos haplotipos en algunos grupos étnicos (11).

4.9.4 Amebiasis pleuropulmonar

- Complicación por rotura de absceso.
- Dolor torácico, tos expectoración, derrame pleural.
- Puede dar fístula y amebiasis cutánea.

4.9.5 Amebiasis cutánea y mucosa

- Pacientes de poca higiene.
- Úlceras perianales y genitales.
- Pueden destruir completamente una región e incluso llegar al hueso.
- Úlcera de fondo húmedo necrótico y olor fétido.
- En preparaciones en fresco se observan abundantes trofozoítos.

4.9.6 Absceso cerebral amebiano

- Secundario a diseminación hematógena.
- La infección puede ser mortal. Se da en pacientes inmunocomprometidos.

4.10 Histopatología de algunos tipos de amebiasis.

Amebiasis cerebral:

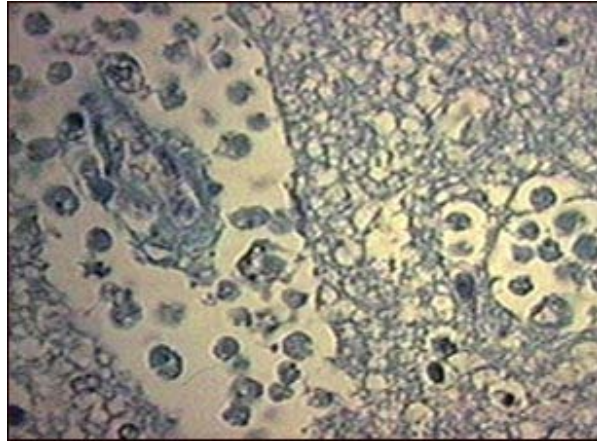


Figura 4. Muestra de tejido cerebral donde se observan las amebiasis (14).

Amebiasis intestinal:

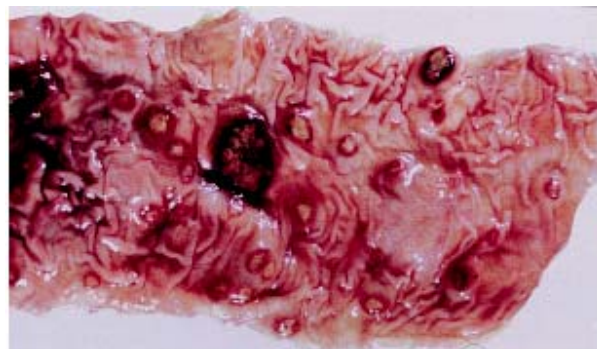


Figura 5. Muestra de tejido intestinal en paciente con colitis amebiana fulminante.

Como se observa en la figura 5 se puede apreciar severas lesiones nodulares pequeñas de 0,1 a 0,5 cm, característica de esta patología. Se observan áreas ligeramente elevadas de la mucosa, con centros necróticos irregulares rodeados por tejido edematoso.

Los centros necróticos están llenos de un material mucoidal amarillento, excepto en 2 úlceras, donde el centro es hemorrágico. Los pliegues de la mucosa tienen un aspecto normal, aunque existe un segmento atascado y edematoso (15).

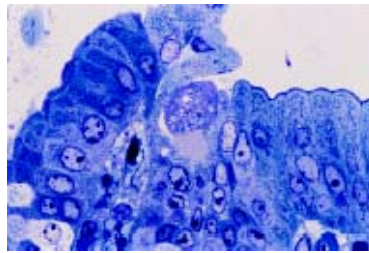


Figura 6. Tejido intestinal de conejo. Forma experimental.

Como se aprecia en la figura 6 con tinción de azul de toluidina, los trofozoítos invaden el epitelio interglandular generalmente se encuentra respuesta de células inflamatorias (neutrófilos). La infiltración de células alrededor de las amebas conduce a una rápida lisis de los neutrófilos y por ende necrosis del tejido. Estas células inflamatorias rara vez se encuentran en raspado de mucosa rectal. Se aprecia una gran pseudovaina (15).

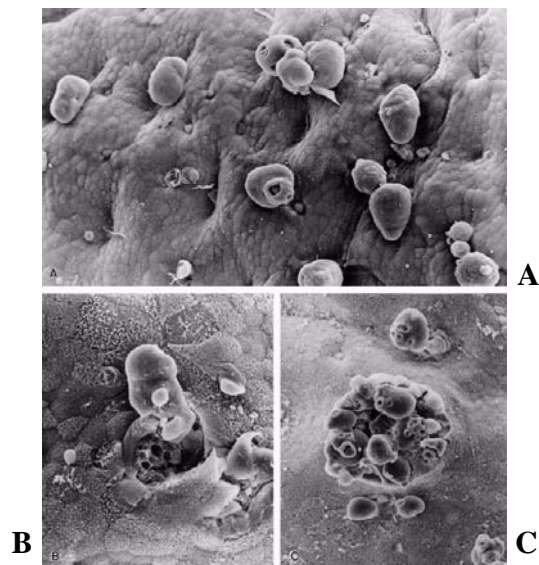


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de tejido intestinal.

La imagen A de la figura 7 muestra como los trofozoítos se adhieren preferencialmente al elevado epitelio interglandular. La imagen B muestra una úlcera superficial, y la imagen C muestra una úlcera más avanzada (15).

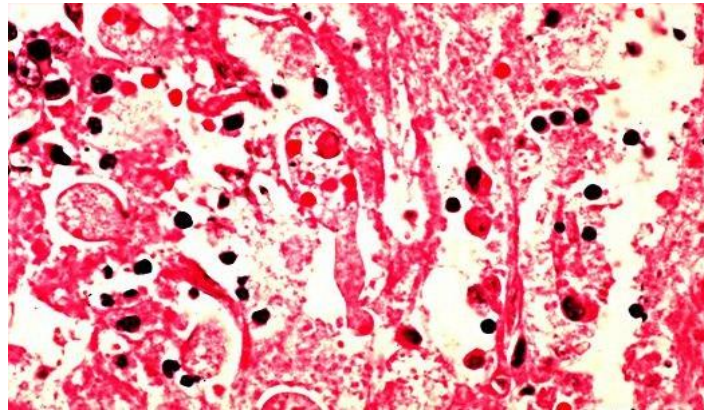


Figura 8. Biopsia hepática de paciente con absceso hepático amebiano. Se observan claramente los trofozoítos y quistes del parásito.”

4.11 Diagnóstico.

Los síntomas más importantes son dolor en el cuadrante superior derecho, fiebre (38-39°C), malestar general, astenia, adinamia y tos no productiva. El dolor aumenta con la respiración y la tos propagándose al hombro derecho cuando hay compromiso diafragmático. En el examen físico se encuentra hepatomegalia dolorosa y dolor puntual a la palpación intercostal o subcostal.

Puede haber leucocitosis con desviación a la izquierda, anemia con hematocrito menor de 35%. Las pruebas hepáticas pueden estar alteradas, por ejemplo la albúmina, el tiempo de protrombina, la fosfatasa alcalina, la AST y las bilirrubinas, aunque estas alteraciones son más frecuentes en el absceso piógeno.

La enfermedad se puede dividir en aguda, con menos de 10 días de sintomatología, y crónica con más de dos semanas de evolución sintomática. La respuesta al manejo es similar tanto en la forma aguda como en la crónica.

Las complicaciones del absceso son sobreinfección, aumento de tamaño del órgano y ruptura hacia órganos vecinos.

Las amebas pueden alcanzar la circulación mayor y distribuirse por vía hematogena a cualquier órgano. Si hay compresión sobre el árbol biliar, se observa ictericia obstructiva. Por tanto el diagnóstico de amebiasis, además de basarse en la sintomatología clínica, que puede ser muy variable, debe ser confirmada por exámenes de laboratorio (18-21-23-29).

4.11.1 Amebiasis intestinal.

El estudio parasitológico de las heces resulta de utilidad en los casos de amebiasis intestinal, dado que es posible observar en la materia fecal la presencia de trofozoítos y más a menudo, de quistes, también puede ser establecido por histopatología en tejidos.

El parásito se observa por microscopía óptica mediante las técnicas de PAF para observar trofozoítos o Telemann modificado para observar quistes, en ambas técnicas las preparaciones son fijadas y teñidas. Las muestras fecales son recolectadas en forma seriada día por medio 3 exámenes por técnica debido a que el protozoo se elimina en forma cíclica obteniendo un 99% de sensibilidad en los 5 días de estudio al realizar ambas técnicas y 70% al realizar solo una (2-19).

4.11.2 Amebiasis hepática (AH).

En la amebiasis extraintestinal como en el absceso hepático el parasitológico seriado no tiene importancia ya que solo confirma amebiasis intestinal y su negatividad no descarta la amebiasis hepática, ya que solo en el 13-45% de los casos el examen es positivo. En el diagnóstico de absceso hepático (AH) se debe tener en cuenta que puede ser de origen amebiano o no amebiano. Si se sospecha clínicamente, se requiere de exámenes imaginológicos como el ultrasonido, inmunológicos y microbiológicos para confirmar la etiología. Sin embargo, la demostración del agente etiológico, en el caso del AHA es de riesgo para el paciente, ya que requiere de métodos invasivos como la punción hepática.

Debido a las dificultades mencionadas, las pruebas inmunodiagnósticas para detectar anticuerpos contra *E. histolytica* han sido de gran utilidad en casos de amebiasis extraintestinal, ya que los anticuerpos antiamebianos en la práctica se observan en la totalidad de los pacientes. Las pruebas serológicas son positivas en más del 90% de los casos, siendo descritas las técnicas de hemoaglutinación indirecta, inmunodifusión (ID), fijación del complemento, conrainmuno-electroforesis, inmunofluorescencia indirecta y ELISA. Por otra parte, el Western-Blot (WB), permite la detección de antígenos específicos de *E. histolytica*, los cuales son reconocidos por sueros de individuos sintomáticos y asintomáticos evitando las reacciones cruzadas con otros parásitos intestinales (18).

Los distintos anticuerpos frente a diversos antígenos de *E. histolytica* y que, mediante inmunoelectrotransferencia, corresponden a proteínas de alrededor de 37, 43, 59, 90, 110 y 170 kD. De todos ellos, el antígeno de 170 kD, que es una glucoproteína con capacidad de fijación (lectina-galactosa), es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específicos en más del 95% de los pacientes con amebiasis invasora. Otro antígeno estructural de superficie, rico en cisteína y cuyo gen codificante fue identificado a principios de la presente década, posee un peso molecular de 29 kD.

La constitución antigénica comentada explicaría la existencia de reactividades cruzadas frente a antígenos específicos del VIH, como la gp160 y la p24 por parte de los individuos infectados por *E. histolytica* y que han desarrollado un absceso hepático (2-3).

Los títulos positivos de IgG por ELISA, contra *E. histolytica* en áreas endémicas, continúa siendo la prueba de referencia para buscar la etiología amebiana en el absceso hepático. Dado que ésta no puede diferenciar una infección aguda de una pasada en áreas de alta endemia, se debe correlacionar la historia clínica y los resultados de laboratorio para definir el diagnóstico y tratamiento, debido a que puede confundirse con un absceso hepático no amebiano o bien que el paciente presente memoria inmunológica para *E. histolytica*. Por esto se requiere el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas que pueden diferenciar infección reciente de pasada por *E. histolytica* y que, a su vez, tengan aplicación en la práctica clínica.

Recientemente fue descrito un método para detección específica de IgA antiameba en saliva. En el estudio se demuestra que sólo los portadores de amebas dan valores de IgA,

pero no las personas que no presentan al parásito en heces. Este trabajo tiene un potencial enorme como herramienta en estudios epidemiológicos ya que puede dar una idea clara de un contacto reciente con *E. histolytica* siendo beneficio, ya que se ha comprobado que 45 días después del tratamiento, los anticuerpos específicos tipo IgA de pacientes tratados disminuyen a niveles basales. Esto demuestra que la presencia de títulos de IgA contra amebas sugiere un contacto reciente o una infección que se acaba de resolver. Esto daría el dato de prevalencia, dato sumamente importante comparado con el de la serología, que no distingue entre un contacto pasado (aun años) o reciente. Dada la facilidad de la obtención y manejo de la saliva (comparando con la de sangre o heces), se piensa que tendrá una enorme utilidad en pruebas de campo (4).

La ecografía, la tomografía axial computadorizada (TAC) y la resonancia nuclear magnética (RMN) permiten localizar y delimitar el absceso con bastante precisión; en general tienen una sensibilidad para absceso hepático amebiano superior al 95%.

La TAC es especialmente útil para detectar lesiones pequeñas. Si se hace con medio de contraste intravenoso es posible establecer el diagnóstico diferencial con quiste hepático, hemangioma o tumor sólido. Las desventajas de la TAC son el costo y la necesidad de medio de contraste que puede inducir reacciones alérgicas o falla renal.

La RMN es considerada la prueba más sensible para evidenciar lesiones hepáticas; sin embargo, no permite diferenciar entre un absceso amebiano y uno piógeno.

La radiografía de tórax es anormal en aproximadamente 50% de los pacientes por reacción inflamatoria en el lóbulo inferior derecho pulmonar (18-19-21-23).

La ultrasonografía (US) es el método ideal no invasivo para el diagnóstico de AH, puesto que es económico, no requiere inyecciones ni catéteres, y no produce radiación gamma ni rayos X por lo que puede ser usado en forma repetida incluso en mujeres embarazadas; sin embargo, es necesario tener en cuenta que de acuerdo al estado de evolución del absceso la ecogenicidad varía. Es importante precisar que la US es dependiente de la experiencia del observador en contraste con la TAC, por tanto, si la US es negativa o dudosa y persiste la sospecha clínica de AH se debe continuar con una TAC dado su alta resolución que hace factible identificar lesiones de pocos milímetros de diámetro, en especial al usar medio de contraste. Por otra parte, la TAC muestra con gran

precisión los órganos abdominales alrededor del hígado y tiene superioridad frente a la US para diferenciar lesiones intrahepáticas de extrahepáticas, también diferencia diversas lesiones focales del hígado como absceso, hemangioma, quiste y tumor. En conclusión, la imagen tomográfica a diferencia de la US tiene menor dependencia del operador; en consecuencia las indicaciones precisas para solicitar tomografía en AH son: diagnóstico no confirmado con otros métodos, persistencia de síntomas a pesar de tratamiento específico, diagnóstico diferencial con otras lesiones.

El AH en general es una enfermedad grave que requiere diagnóstico temprano y tratamiento inmediato. El cuadro clínico tiene síntomas y signos similares en absceso hepático amebiano (AHA), absceso hepático no amebiano (AHNA) o absceso hepático mixto (AHM). En nuestro medio, el diagnóstico de AH siempre debe contemplarse ante la presencia de síndrome febril de origen desconocido. La ecografía hepática es el examen imaginológico de primera elección ante la sospecha de AH por historia clínica, pero no se requiere seguimiento ecográfico para definir la mejoría del paciente, ésta se hace por medio de los datos clínicos, síntomas y signos, y de otros paraclínicos como el CH y la VSG. Por tanto en pacientes asintomático, es decir con respuesta clínica adecuada al tratamiento, no amerita controles ecográficos repetidos que incluso pueden conducir a la realización de procedimientos invasivos innecesarios como la punción hepática.

Los resultados sugieren que ante el diagnóstico clínico de AH confirmado por ultrasonido, y en ausencia de pruebas de ELISA e ID, el análisis de las 3 variables predictivas edad, hematocrito y diferencia del PT tiene suficiente capacidad discriminadora y permite inferir cuando es AHA o AHNA y tomar la decisión diagnóstica y terapéutica (3-19-21-23-24).

4.11.3 Diagnostico diferencial

Debe hacerse diagnóstico diferencial con absceso hepático piógeno, absceso subfrénico, quiste hidatídico infectado, hepatitis viral o alcohólica, apendicitis, pancreatitis. También deben excluirse enfermedades pulmonares como neumonía, derrame pleural,

tromboembolismo pulmonar y enfermedades malignas como carcinoma hepatocelular, linfoma o enfermedad metastásica del hígado (18-21).

4.12 Tratamiento.

El tratamiento de la amebiasis intestinal debe hacerse siempre, pues aún en personas asintomáticas es necesario exterminar los parásitos del intestino con dos finalidades: evitar que en algún momento haya invasión de los tejidos y eliminar la fuente de infección.

Los fármacos para tratar la amebiasis pueden clasificarse según su principal lugar de acción. Los amebicidas lumbinales se absorben poco y alcanzan elevadas concentraciones en el interior del intestino, pero su actividad se limita a los trofozoítos que están junto a la mucosa. Las indicaciones para la utilización de los agentes lumbinales son los pacientes con colitis o un absceso hepático y el tratamiento de portadores asintomáticos.

Los amebicidas tisulares alcanzan elevadas concentraciones en la sangre y los tejidos tras su administración por vía oral o parenteral. El desarrollo de compuestos de nitroimidazol, especialmente metronidazol fue un importante avance en el tratamiento de la amebiasis invasiva.

Los pacientes con colitis amebiana deben tratarse con metronidazol, 750 mg, tres veces al día, por vía IV o por vía oral, durante diez días. Entre los efectos colaterales se encuentran las náuseas, los vómitos y malestar abdominal. El metronidazol también es el fármaco de elección para el tratamiento del absceso hepático amebiano.

Ninguno de los amebicidas ejerce efecto sobre los quistes. La erradicación de los quistes se logra al eliminar los trofozoítos (8-29).

Tabla 1. Medicamento utilizado al tratamiento, dosis e indicaciones.

Droga	Dosis diaria Adultos Niños	Ritmo de administración diaria	
Amebiasis Aguda:			
Metronidazol	2250 mg	30-50 mg	3 veces x 5-10 días
Tinidazol	2000 mg	50-75 mg	1 vez x 2 días
Emetina Clorhidrato	40 mg	1 mg	1-2 inyecciones x 5 días
Amebiasis Crónica:			
Metronidazol	2250 mg	30-50 mg	3 veces x 10 días
Tinidazol	2000 mg	50-75 mg	1 vez x 2 días
Alternativos:			
Diyodohidroxiquinoleina	1800 mg	30-40 mg	3 veces x 20 días
Fenantrolinquinona	300 mg	5 mg	3 veces x 10 días
Paromomicina	1500 mg	25-30 mg	3 veces x 5-7 días

5. MATERIALES Y METODO

5.1 Lugar de estudio.

El estudio se realizó en la ciudad de Talca, Séptima Región. Se trabajó con 78 muestras de suero pertenecientes a pacientes de diferentes edades y ambos sexos que presentaban pruebas hepáticas alteradas tales como aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (GPT), fosfatasa alcalina (FAL) y bilirrubinas.

5.2 Muestra.

Las muestras fueron recolectadas durante los meses de Agosto a Noviembre del 2004, en el Laboratorio de Química del Hospital Regional de Talca, y analizadas en el laboratorio de Parasitología de la Universidad de Talca, el estudio consistió en detectar anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* de tipo IgG ocupando el Kit Amoeba-Spot IF de la empresa bioMérieux esta es una prueba para el serodiagnóstico de amebiasis por inmunofluorescencia indirecta en suero humano.

Los sueros fueron congelados a $-25 \pm 6^{\circ}\text{C}$ evitando las congelaciones y descongelaciones sucesivas. Se rechazo todo suero hemolizado, lipémico o contaminado, así mismo se rechazaron aquellas muestras que presentaron pruebas hepáticas alteradas con serología positiva para VIH, diagnóstico de cualquier tipo de cáncer y terapia con algún tipo de antibiótico.

A su vez se obtuvo suero control positivo que presentaban anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* y suero control negativo ambos proporcionados por el Instituto de salud pública (ISP) permitiendo la estandarización de la técnica.

5.3 Reactivos.

- Kit Amoeba-Spot IF (REF 72 901) *Entamoeba histolytica* obtenida a partir de cultivo axénico inactivada y fijadas sobre el porta, para 100 determinaciones. Estos fueron conservados a 2-8°C en su envuelta estanca con el deshidratante.
- Fluoline G. Composición: Globulina de cabra anti IgG humana específicas marcadas con fluoresceína y diluida en glicerol.
- PBS. Composición: NaCl 8.5 g + KH₂PO₄ 0.295 g + Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.37 g en 1000 ml de agua destilada. pH 7.4 – 7.6.
- Azul de Evans. Composición 1 g / 1000 ml de PBS.
- Glicerina tamponada. pH 9.6
- Agua destilada.
- Suero control positivo y negativo.

5.4 Materiales.

- Microscopio de inmunofluorescencia (objetivo x 40). Modelo Olympus CX31.
- Estufa a 37°C.
- Cámara húmeda.
- Tubos de vidrio para diluir las muestras y conjugado.
- Cubreobjetos (60 x 24 mm).
- Pipetas de punta desechable de 10 a 500 µl.

5.5 Técnica.

5.5.1 Fundamento.

Esta técnica permite identificar anticuerpos presentes en el suero específicos para *Entamoeba histolytica*.

La reacción inmunológica consiste en dos etapas:

1. Las inmunoglobulinas séricas humanas anti – *Entamoeba histolytica* de tipo IgG eventualmente presentes en la muestra se unen a los parásitos (antígeno) depositados sobre los portas. En los pocillos se produce la reacción antígeno–anticuerpo durante la primera incubación a 37°C. Los elementos no fijados se eliminan por lavados.

2. Luego se revela la reacción anterior aplicando un segundo anticuerpo en el porta que se enlaza a las inmunoglobulinas séricas humanas durante la segunda incubación a 37°C, este segundo anticuerpo corresponde a un conjugado de globulina anti – humana de tipo IgG ligado químicamente a un fluorocromo llamado fluoresceína. Los elementos no fijados son eliminados por lavados.

La lectura de la reacción antígeno – anticuerpo se hace con un microscopio de fluorescencia, empleando como medio de contraste el Azul de Evans.

5.5.2 Estandarización de la técnica.

1. Los reactivos, portas y muestras se llevaron a temperatura ambiente aproximadamente 15 min.

2. Se realizaron diluciones sucesivas al suero control positivo de 2 en 2 con PBS: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800.

3. Se confecciono una tabla de diluciones del suero v/s diluciones del conjugado de la siguiente manera.

suero conjugado	suero				
	1/100	1/200	1/400	1/800	control
1/20	10 µl de suero 1/100	10 µl de suero 1/200	10 µl de suero 1/400	10 µl de suero 1/800	10 µl de PBS
1/40	10 µl de suero 1/100	10 µl de suero 1/200	10 µl de suero 1/400	10 µl de suero 1/800	10 µl de PBS
1/80	10 µl de suero 1/100	10 µl de suero 1/200	10 µl de suero 1/400	10 µl de suero 1/800	10 µl de PBS

4. Los 10 µl de cada dilución del suero y control fueron puestos en contacto con el antígeno que esta en el interior de los círculos del porta (una dilución por círculo).

5. Luego, incubar el porta 30 min a 37° C en cámara húmeda.
6. Lavar los portas por inmersión en PBS 2 veces 5 min. Escurrir y secar.
7. Preparar el conjugado luego del primer lavado. Se realizaron diluciones sucesivas al Fluoline H de 2 en 2 con PBS y Azul de Evans, estos dos últimos deben estar en una relación 9:1 respectivamente. Las diluciones del conjugado fueron las siguientes 1/20, 1/40, 1/80.

	Dilución 1/20	Dilucion 1/40	Dilucion 1/80
PBS	180 µl	90 µl	90 µl
Azul de Evans	20 µl	10 µl	10 µl
Fluoline H	10 µl	100 µl (1/20)	100µ l (1/40)

8. Recubrir cada círculo del porta, incluido el control con 10 µl del conjugado. Tal como se había confeccionado en la tabla de diluciones.

suero conjugado	suero				
	1/100	1/200	1/400	1/800	control
1/20	10 µl conjugado 1/20	10 µl conjugado 1/20	10 µl conjugado 1/20	10 µl conjugado 1/20	10 µl conjugado 1/20
1/40	10 µl conjugado 1/40	10 µl conjugado 1/40	10 µl conjugado 1/40	10 µl conjugado 1/40	10 µl conjugado 1/40
1/80	10 µl conjugado 1/80	10 µl conjugado 1/80	10 µl conjugado 1/80	10 µl conjugado 1/80	10 µl conjugado 1/80

9. Incubar 30 min a 37° C en cámara húmeda.
10. Lavar los portas por inmersión en PBS 2 veces 5 min. Pasar rápidamente por un baño de agua destilada. Escurrir y secar. Depositar 1 gota de glicerina tamponada sobre cada pocillo. Poner un cubreobjetos.
11. Las placas deben estar protegidas de la luz y se leen en el microscopio de inmunofluorescencia

Una vez que se ha estandarizado la técnica, se procede de la misma manera eligiendo la dilución que se debe hacer a los sueros recolectados y al conjugado.

5.6 Lectura.

Se debe verificar la ausencia de fluorescencia del control del conjugado. Las amebas de la preparación aparecen en rojo y no debe observarse ninguna fluorescencia de membrana. Si el control presenta una fluorescencia de membrana, la serie no debe ser validada y las muestras deben ser analizadas en otra serie.

- Reacción negativa: aspecto idéntico al control del conjugado. Algunos sueros a la dilución 1/50 pueden dar una ligera fluorescencia irregular limitada a la membrana.

- Reacción positiva: la fluorescencia puede ser intensa y observarse sobre toda la superficie de la ameba o puede ser observada como una línea clara en la membrana citoplasmática.

5.7 Interpretación.

Título del suero: inversa de la mayor dilución que muestre una reacción positiva.

Títulos ≤ 50 excluye en general toda infección por ameba.

Títulos ≥ 100 corresponden en general a una amebiasis (20).

6. RESULTADOS

En la estandarización de la técnica las diluciones del conjugado y las diluciones del suero se representan en la tabla N° 2.

Tabla 2. Diluciones de conjugado y suero.

suero conjugado	1/100	1/200	1/400	1/800
1/20	3+	3+	+	-
1/40	2+	2+	-	-
1/80	±	±	-	-

La máxima dilución de conjugado y suero donde aun se aprecia reacción positiva es 1/200 para el suero y 1/40 para el conjugado, sin embargo esta reacción es de 2+ por lo tanto se procedió a realizar una nueva dilución del conjugado 1/60 conservando la dilución del suero, donde se obtuvo una reacción de 1+.

Por tanto con una dilución 1/200 para el suero y 1/60 para el conjugado se estandarizo la técnica en el estudio del anticuerpo en las muestras.

Se recolectaron 102 muestras de suero con pruebas hepáticas alteradas, con valores 3 o 4 veces sobre lo normal, de las cuales se descartaron 24 por presentar hemólisis marcada e hiperlipidemia evidente, contaminación de la muestra y terapia con algún tipo de antibiótico.

La tabla N° 3 informa los resultados de la fluorescencia obtenido con las 78 muestras seleccionadas, además muestra los valores de sus pruebas hepáticas expresadas en U/l para la actividad enzimática de GOT, GPT, ALP y en mg/dl para bilirrubina total, directa e indirecta.

Los controles positivos y negativos fueron efectuados por serie de sueros, se verifico la ausencia de fluorescencia del control validando todas las series, esto permitió el control de calidad de los reactivos, las reacciones se observan en la figura 9 y 10.

Tabla 3. Resultados de las pruebas hepáticas y serológicas a las muestras de suero.

Muestra	GOT	GPT	ALP	Bil T	Bil D	Bil I	Reacción
1	787	860	180	35,8	22,9	12,9	(—)
2	544	664	295	9	5,8	3,2	(—)
3	120	149	136	1,7	0,5	1,2	(++)
4	194	342	194	3,7	1,2	2,5	(—)
5	168	141	331	1,4	0,4	1	(—)
6	95	283	148	8,3	0,26	8,04	(—)
7	144	227	192	1,1	0,1	1	(—)
8	139	256	272	1,4	1	0,4	(—)
9	150	111	184	1,3	1,1	0,1	(—)
10	144	148	204	1	0,4	0,6	(—)
11	106	189	149	2	0,5	1,5	(—)
12	146	294	460	1,7	1,2	0,5	(—)
13	170	306	480	6,2	4,7	1,5	(—)
14	116	131	214	1,1	0,8	0,3	(—)
15	274	97	559	2,1	1,8	0,3	(±)
16	162	267	471	8,1	6,3	1,8	(—)
17	160	235	298	1,6	1,3	0,3	(—)
18	610	436	268	7,2	3,8	3,4	(—)
19	187	316	431	12,1	9	3,1	(—)
20	128	164	162	9,9	7,4	2,5	(—)
21	97	200	537	2	0,8	1,2	(—)
22	158	167	195	1,3	1,1	0,2	(—)
23	414	385	319	18,9	12,6	6,3	(—)
24	110	230	263	1,3	0,45	0,85	(—)
25	94	191	160	1,7	0,63	1,07	(—)
26	142	165	640	2,9	1,79	1,11	(±)
27	170	93	656	10	7,43	2,57	(—)
28	92	141	166	2,6	1,4	1,2	(—)
29	256	92	159	3,1	2,1	1	(—)
30	155	174	386	1,1	0,9	0,2	(—)
31	129	133	160	1,6	0,5	1,1	(—)
32	1333	697	149	3	2,3	0,7	(—)
33	85	143	1233	1,4	1,1	0,3	(—)
34	166	178	177	1,2	0,4	0,8	(—)
35	150	258	143	3,3	1,7	1,6	(—)
36	108	114	151	1,6	1,3	0,3	(—)
37	101	82	232	2,5	1,8	0,7	(—)
38	90	163	376	1,6	1,1	0,5	(—)
39	128	108	285	3,6	2,9	0,7	(—)

40	136	220	199	1,7	0,9	0,8	(—)
41	327	406	309	2	1,4	0,6	(—)
42	141	113	1047	1,4	0,1	1,3	(—)
43	124	180	133	2,9	1,8	1,1	(—)
44	116	172	137	1,4	1,2	0,2	(—)
45	176	124	321	1,6	1,3	0,3	(—)
46	77	264	340	3,8	2,8	1	(—)
47	114	205	784	2,3	1,36	0,94	(—)
48	129	100	647	2,4	1,63	0,77	(—)
49	76	148	369	3,3	2,01	1,29	(—)
50	302	420	137	0,9	0,36	0,54	(—)
51	174	165	154	10,2	4,7	5,5	(—)
52	306	149	167	1,7	1,28	0,42	(—)
53	163	196	258	5,8	3,7	2,1	(—)
54	376	150	186	1,2	1	0,2	(—)
55	123	203	155	2,3	1,6	0,7	(—)
56	131	167	186	2,1	1,3	0,8	(—)
57	140	93	277	1,4	1	0,4	(—)
58	98	95	162	2,7	2,1	0,6	(—)
59	83	116	251	5,1	2,1	3	(—)
60	108	154	262	2,5	0,8	1,7	(—)
61	103	163	185	1,3	0,4	0,9	(—)
62	102	149	225	3,6	2,8	0,8	(±)
63	201	671	275	1,8	0,32	1,48	(—)
64	74	253	310	3,4	2,2	1,2	(—)
65	153	536	348	2,9	2	0,9	(—)
66	129	113	876	4,9	3,6	1,3	(—)
67	172	167	190	1,7	0,5	1,2	(—)
68	98	171	196	2,5	0,65	1,85	(—)
69	183	805	152	3,1	2,3	0,8	(—)
70	169	223	130	1,1	0,56	0,54	(—)
71	193	116	443	2,7	0,38	2,32	(—)
72	122	447	252	8,8	0,7	8,1	(—)
73	181	154	151	1,3	0,3	1	(—)
74	80	153	823	1,9	1,2	0,7	(—)
75	107	82	590	3,8	1,7	2,1	(—)
76	273	98	641	1,7	1,11	0,59	(—)
77	110	182	232	2,5	0,91	1,59	(—)
78	76	158	186	1,5	0,4	1,1	(—)

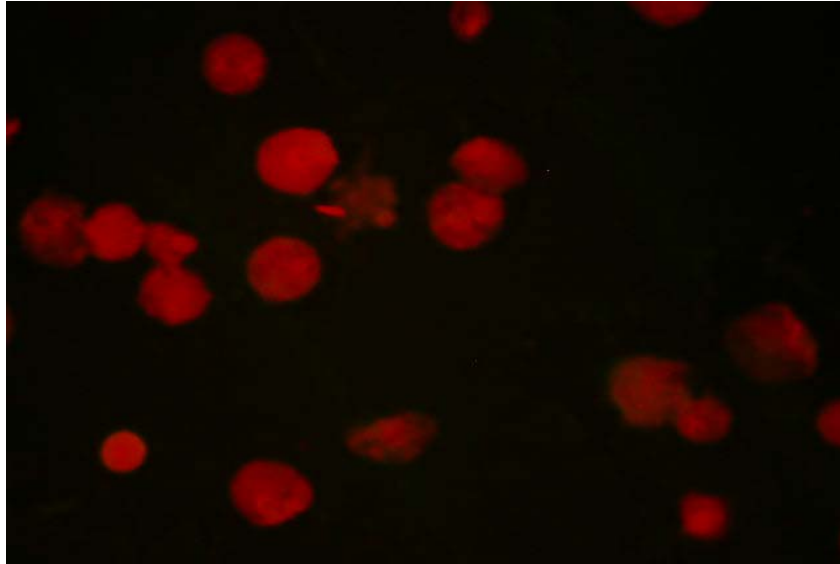


Figura 9. Control negativo para anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica*. Se observa a las amebas de color rojo con total ausencia de fluorescencia de membrana. Vista con aumento mayor.

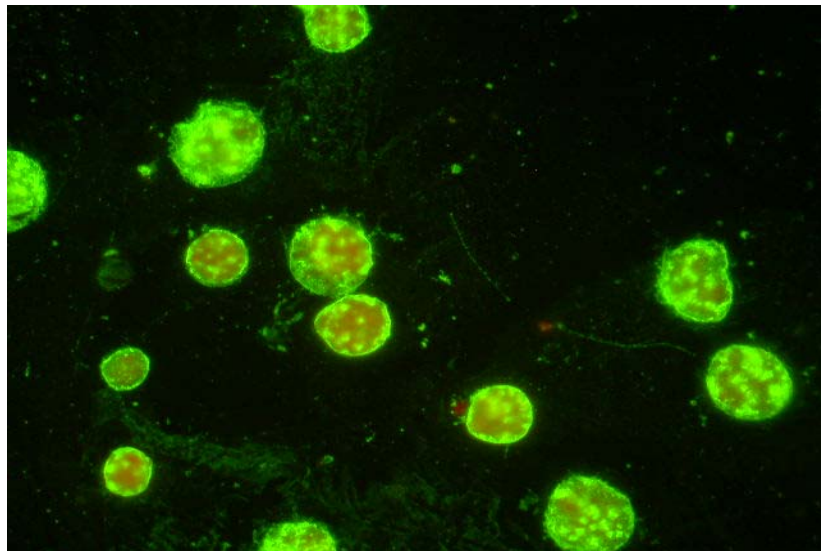


Figura 10. Control positivo para anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica*. Se observa a las amebas con fluorescencia en su superficie y mas marcadamente en membrana citoplasmática. Vista con aumento mayor.

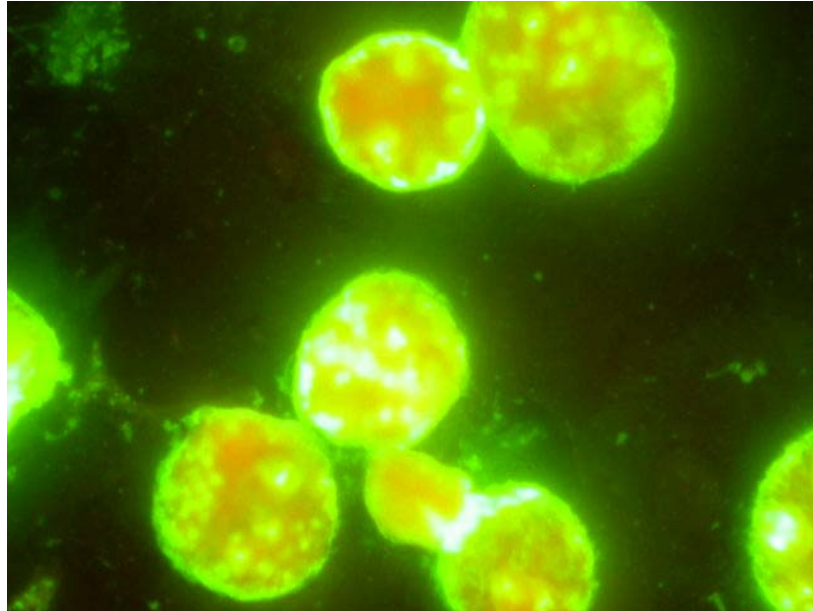


Figura 11. Control positivo para anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica*, vista con inmersión.

Los datos fueron analizados en el programa estadístico Epi Info versión 6.04d, con esto se pudo obtener que el tamaño de la muestra y por tanto los datos obtenidos eran representativos con un 99,99% de confianza.

De un total de 78 muestras de suero los resultados en la determinación de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* fueron los siguientes:

- 1 reacción positiva de 2+.
- 3 reacciones de \pm .
- 74 reacciones negativas.

Tabla 4. Determinación de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* en suero.

Reacción	Nº de muestras	Porcentaje
Positiva	1	1,28
Negativa	74	94,87
Dudosas	3	3,84
Total	78	100

Por tanto, la prevalencia de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* es de 1,3% en pacientes con pruebas hepáticas alteradas en el Hospital Regional de Talca.

El suero de reacción positiva fue evaluado semicuantitativamente, determinando el título de anticuerpo, este fue de 256.

7. DISCUSIÓN

En la estandarización de la técnica la dilución adecuada del conjugado y del suero arrojó resultados óptimos para el estudio de las muestras, esta dilución se obtiene por la máxima dilución del suero y conjugado donde se aprecia una reacción positiva, por tanto la sensibilidad de la técnica fue de 1/60 para el conjugado y 1/200 para el suero. En cuanto a la especificidad por tratarse de una técnica serológica posee más del 90% de positividad de los casos. La detección inmunológica de los anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* mediante inmunofluorescencia indirecta es una ayuda en el diagnóstico de amebiasis, este método es sensible y específico permitiendo la visualización de la ameba. Importante es tener en consideración que la interpretación de los resultados por inmunofluorescencia debe hacerse teniendo en cuenta el contexto clínico y los resultados de otras pruebas como scanner o ecografía.

En cuanto al título obtenido en la estandarización de la técnica, la dilución del suero 1/200 nos parece acertada ya que en las instrucciones del fabricante un título de suero ≥ 100 es significativa e interpretativa como amebiasis, en la dilución del conjugado si bien esta es baja 1/60 nosotros trabajamos con un Fluoline G específico para IgG humana, recordar que en la amebiasis también se forman anticuerpos de tipo IgA e IgM es por esto que en el inserto se recomendaba trabajar con un Fluoline H. Puede también que el reactivo se halla deteriorado por exposición continua a la luz u otros factores. Sin embargo esta dilución fue aceptada y comprobada en la estandarización ya que la dilución 1/80 fue negativa.

De las muestras analizadas mediante técnica de inmunofluorescencia sólo una muestra fue positiva. Si bien es cierto no existen en nuestro país datos o estudios relacionados con absceso hepático amebiano, se puede inferir en cierto modo, que el paciente positivo para anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica*, tal vez tiene esta patología dado por la alteración de sus pruebas hepáticas, cosa que ocurre con frecuencia cuando está presente esta enfermedad, pero también puede no tenerla, y la explicación de la presencia de anticuerpos en su suero es por una respuesta inmunológica de hasta 10 años antes. Para confirmar ambas hipótesis se necesitaría tener otros datos del paciente, como cuadro clínico, pruebas imagenológicas como TAC, etc, que den antecedentes de diagnóstico, por

lo que lo anterior es sólo presuntivo.

Por lo mismo no hemos querido realizar un estudio comparativo relacionado con absceso hepático amebiano (AHA) ya que no sabemos realmente si la alteración de las pruebas hepáticas de los pacientes se encuentran alterados por este motivo, lo que es muy poco probable, o por otra causa que produzca daño al hígado. Lo único que podemos afirmar realmente es que de 78 muestras de suero analizadas, con alteraciones en sus pruebas hepáticas de laboratorio una muestra fue positiva.

En cuanto al título de esta misma, este fue relativamente bajo (1/256) lo que indicaría enfermedad muy reciente, donde recién comienzan a aumentar los niveles de anticuerpos, o bien el paciente podría tener anticuerpos por la presencia del parásito hasta 10 años anteriormente, y su nivel de anticuerpos disminuyó en el tiempo, recordar que en el estudio se determinó la presencia de anticuerpos de tipo IgG. Ambas hipótesis no la podemos afirmar, sería necesario realizar otras pruebas.

La seroprevalencia de anticuerpos anti – *Entamoeba histolytica* en el presente trabajo fue de 1,3%, presentándose solo un caso de 78 pacientes estudiados, este valor es menor que los resultados reportados en el trabajo de 1984 por la revista médica de Chile donde se describe un 8,9% a nivel nacional. En aquel estudio la mayor frecuencia se encontró en Iquique demostrando que la infección por *Entamoeba histolytica* depende de las condiciones climáticas (tropicales) variando por tanto de un área geográfica a otra.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bernal-Redondo, R. 2001. Entamoebosis-amibiasis intestinal *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México; Vol. 58(4):217-219.
2. Eiros Bouza, JM.; Ortiz de Lejarazu R. Diagnostico serológico de la infección por *Entamoeba histolytica* en pacientes procedentes de áreas endémicas. Departamento de Microbiología e Inmunología. Hospital Universitario de Valladolid. Disponible en www.seimc.org/control/revi_Sero/amebas.htm.
3. Pinilla R, A.; López P, M.; Castillo M, B.; Murcia A, M.; Nicholls O, R.; Duque B, S.; Orozco V, L. 2003. Enfoque clínico y diagnóstico del absceso hepático. Revista Médica de Chile; Vol. 131, N° 12, pp. 1411-1420.
4. Marco V. José.; 1992. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. Salud publica de México. Vol.34, No.3.
5. Chacín-Bonilla, L. 2001. Relevancia del reconocimiento de *Entamoeba dispar* en la Amibiasis. Maracaibo. Investigacion clínica Vol. 42, N° 3, editorial.
6. Jackson, T.F.; Gathiram, V.; 1985. Simjee, A. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. Lancet N° 84311, pp 716-719.
7. Tannich E., Horstmann R.D., Knobloch J., Arnold H.H. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proceedings of Sciences of the United States of America. Vol. 86, N° 13, pp. 5118-5122.
8. Departamento de ciencias fisiológicas. 2000. Clase de antiprotozoario. Sesión 77. Disponible en www.monografias.com/trabajos5/amebia/amebia.shtml.
9. Caballero-Salcedo, A.; Viveros-Rogel, M.; Salvatierra, B.; Tapia-Conyer, R.; Sepulveda-Amor, J.; Gutiérrez, G.; Ortiz-Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. Tropical Medicine and Higiene. Vol. 50, N° 4, pp. 412-9.
10. Carrada-Bravo T. 1989. La amibiasis invasora como problema de salud pública. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. Vol. 46, pp. 139-148.
11. La *Entamoeba histolytica* y la amibiasis una pequeña revisión de aspectos inmunológicos relevantes de este problema de salud publica. Disponible en <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas/020723155256.html>.

12. The Wellcome Trust Sanger Institute, vista entera del genoma. Disponible en: http://216.239.37.104/translate_c?hl=es&u=http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_histolytica/&prev=/search%3Fq%3DEntamoeba%2Bhistolytica%26start%3D20%26hl%3Des%26lr%3D%26sa%3DN.
13. Amebiasis. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/udas/Parasitologia/Amebiasis/sld007.htm>
14. Michael C. Milone, M.D., Ph.D. 2004. Absceso cerebral amebiano. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA. Enciclopedia médica en español. Disponible en: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1047.htm
15. Espinosa Castellano, M.; Martinez Palomo, A. 2000. Clinical Microbiology Review Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. Center for Research and Advanced Studies, Mexico City. Vol. 13, N° 2, pp. 318-331.
16. Herskovic, P.; Astorga, B. 1984. Revista Medica de Chile, Seroepidemiología de la infección por *E. histolytica* en Chile. Vol. 112, pp 499-502.
17. Rawal, S.; Majumdar, S.; Dhawan, V.; Vohra, H. 2004. *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defences of target epithelial cells. Parasitology. Vol 128, pp. 617–624.
18. Mojica Peñaranda, M.; Mojica Muñoz, E. Hospital de Puerto Colombia. Absceso hepático. Disponible en: http://www.aibarra.org/Apuntes/criticos/Guias/gastrointestinales/Absceso_hepatico.pdf
19. William A. Sodeman, Jr. Intestinal Protozoa: Amebas. Disponible en: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch079.htm>
20. bioMérieux. 2003. REF 72 901. Amoeba-Spot IF. Prueba para el serodiagnóstico de la amebiasis por inmunofluorescencia indirecta en suero humano.
21. Wells D, Christopher; Arguedas, M. 2004. Amebic Liver Abscess. Southern Medical Journal. Vol. 97, N° 7, pp. 673-681.
22. Freitas, M.A.; Vianna, E.N.; Martins, A.S.; Silva, J.L. 2004. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. Parasitology. Vol. 128, pp. 625-628.
23. Contreras, M.C. 1990. Inmunodiagnostico de las parasitosis humanas. Boletín Chileno de parasitología. Vol.45, pp. 13-18.

24. Sagua, H.; Araya, J.; Duberliz, C.; Hartard, M.E.; 1992. Amibiasis intestinal en Antofagasta, Chile. Boletín Chileno de Parasitología. Vol. 47, pp. 58-60.
25. Furrows, S.J.; Moody, A.H.; Chiodini P.L.; 2004. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Journal of Clinical Pathology. Vol. 57, N° 12, pp. 1264-1266.
26. Kaur, U.; Sharma, A. K.; Sharma, M.; Vohra, H. 2004. Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin-Specific Antibody Response in an Endemic Area. Scandinavian Journal of Immunology. Vol. 60, N° 5, pp. 524-528.
27. Atias, A. 1995. Parasitología Clínica. Atias-Neghme. Santiago, Mediterráneo. Capítulo 11 Protozoosis, pp.130-141.
28. Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud de los Estados Unidos de América. Diagnóstico de Laboratorio de la Amibiasis.
29. Garcia, L.S.; Bruckner, D.A. Diagnostic Medical Parasitology. Third Edition. Capítulo 2 Intestinal Protozoa: Amebae, pp.3-28.
30. Bakker-Grunwald, T. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. Parasitol Today. Vol. 9, N° 1, pp. 27-31.
31. Denis M , Chadee K . 1988. Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections. Parasitology Today. Vol. 4, N° 9, pp. 247-52.