

# COMPORTAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS CIRCULANTES EN INFECCIONES POR ENTAMOEBA HISTOLYTICA

M. RESTREPO, F. DE RESTREPO , D. BOTERO

En una comunidad con amibiasis intestinal endémica, se tomaron 113 personas en cuyas materias fecales se observó *Entamoeba histolytica*. El grupo total fué tratado con una droga anti-amibiana no absorbible y luego dividido en dos nuevos grupos. El primero recibió una droga profiláctica dos veces por semana, durante un año. El segundo recibió en igual forma y durante el mismo tiempo un placebo. A cada uno de los pacientes antes del tratamiento se les practicaron las reacciones serológicas de hemaglutinación indirecta, fijación de complemento e inmunodifusión en agar, para la búsqueda de anticuerpos circulantes contra *E. histolytica*. Después del tratamiento, ambos grupos fueron estudiados a los 3,6,9

y 12 meses, con las mismas reacciones serológicas y con examen coprológico directo y por concentración.

En los dos grupos, el comportamiento serológico con las dos primeras pruebas mostró un gran paralelismo antes del tratamiento y a lo largo del año del estudio; sin embargo se observaron variaciones en la positividad de ambos grupos cuando se compararon las pruebas iniciales y las finales.

En el seguimiento parasitológico se encontró que después del tratamiento inicial, permanecieron sin amibas al examen coprológico el 32.7% de los pacientes con droga profiláctica y el 14.6% del grupo con placebo. Al analizar las reacciones serológicas a lo largo de los 12 meses se observó que el tratamiento anti-amibiano inicial modificó los niveles de anticuerpos circulantes. El cambio de las reacciones serológicas por este tratamiento fue visible a partir de los 6 meses. La profilaxis anti-amibiana por sí sola, no modificó significativamente los niveles de anticuerpo.

## INTRODUCCION

Las altas incidencia y prevalencia de la amibiasis intestinal informadas en diferentes grupos de población colombiana (1-3), han hecho considerar a esta entidad como un

---

Trabajo realizado con el auspicio de COLCIENCIAS ,  
COLOMBIA.

Drs. Marcos Restrepo, Fabiola de Restrepo y David Botero Ramos: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín .Colombia.

Solicitud de separatas al Dr. Restrepo: Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Apartado aéreo No. 73-78, Medellín, Colombia.

verdadero problema de salud pública. La investigación nacional de morbilidad (4) informó en 1969 que aproximadamente la cuarta parte de la población (23.7%) estaba infectada por *Entamoeba histolytica*. El absceso hepático amibiano también existe entre nosotros como una complicación importante de la amibiasis, según lo muestran las series de pacientes estudiados (5,6). Las encuestas de salud pública en población general (1-4), mediante exámenes coprológicos, han encontrado muchas personas con *E. histolytica* pero sin manifestaciones de enfermedad; estas frecuentes infecciones han originado una serie de interrogantes acerca del comportamiento de algunas cepas del parásito y de los mecanismos que puede aportar el huésped para modificar o impedir la invasión de la amiba. Biagi y Beltran (7) describieron tres etapas fundamentales en la invasión de *E. histolytica* al organismo:

- a- El establecimiento del parásito en la luz intestinal,
- b- La invasión de la pared intestinal,
- c- La migración de la amiba al hígado u otros sitios extraintestinales

Si tenemos en cuenta el sitio donde está localizado el parásito, podemos explicar el grado de respuesta inmune del huésped.

El diagnóstico de certeza de una infección amibiana se hace mediante la demostración del parásito, pero por diversas razones el hallazgo e identificación de la amiba no siempre es posible y se encuentran situaciones de falsos negativos y en algunos casos de falsos positivos por errores diagnósticos. En la amibiasis extraintestinal es más sobresaliente este hecho, como ocurre en el absceso hepático amibiano, en el cual la observación de los trofozoitos se hace en un reducido porcentaje de casos.

Con los experimentos de Dopter (8) en 1905, se comenzaron a desarrollar procedimientos orientados a la demostración indirecta de este protozoo en el organismo de los pacientes. Desde este tiempo se ha insistido en el empleo de métodos serológicos iniciados por Craif (9,10) en 1927, quien dió el primer paso significativo al establecer una reacción de fijación del complemento para ayudar al diagnóstico de la amibiasis; utilizó en esta ocasión, por primera vez, un

antígeno constituido por un extracto alcohólico de amibas cultivadas en un medio artificial con bacterias, que presentaba poca especificidad (9-13). Con el éxito de Diamond (14) en 1961, al cultivar *E. histolytica* en un medio axénico, se dió un paso decisivo para la preparación de un antígeno con alto grado de pureza y una mayor especificidad (15,16). Se han estudiado diversas técnicas serológicas para aplicarlas con este tipo de antígeno y con ellas se ha logrado mejor correlación entre el resultado serológico y el grado de infección. De las diferentes pruebas propuestas, sobresalen la hemaglutinación indirecta, la fijación del complemento, la inmunodifusión en agar y la prueba del látex (15-20). Todos los autores coinciden en darle mayor importancia al diagnóstico serológico como evidencia de amibiasis invasiva.

Con el presente trabajo nos proponemos determinar la presencia de anticuerpos hemaglutinantes, fijadores del complemento y precipitantes en un grupo de pacientes amibianos y hacer un seguimiento de los niveles de estos anticuerpos durante un año, después de haber tratado a los pacientes con drogas anti-amibianas y de suministrar la quimioprofilaxis para esa parasitosis.

#### MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en un barrio suburbano de la ciudad de Medellín, considerado endémico para amibiasis y otras parasitosis intestinales.

a. Población: Inicialmente se examinaron un total de 301 personas mayores de 10 años para seleccionar aquellas que tuvieran *E. histolytica* en sus materias fecales. Finalmente el grupo se redujo a 113 pacientes parasitarios quienes permanecieron en el estudio y fueron seguidos durante un período de 12 meses.

b. Estudio parasitológico: El método utilizado para la selección de los pacientes fué el examen coprológico. A cada uno de ellos se les indagó sobre sintomatología que correspondiera a su amibiasis, para tratar de clasificar el caso en agudo, crónico o asintomático. Después de llevar a cabo el tratamiento anti-amibiano se repitió el examen parasitológico a los 3, 6, 9 y 12 meses haciéndoles cada vez un coprológico y una

concentración según el método de Ritchie (21).

c. Estudio serológico: Cada uno de los pacientes en estudio fué sangrado por punción venosa para obtener 15ml. de sangre, tomada con un tubo seco al vacío, con aguja No.20 adaptable a este tipo de tubo (vacutainer (R), Becton Dickinson Co., New Jersey, U. S. A.). Después de ocurrir la retracción del coágulo a temperatura ambiente, se separó el suero estérilmente y se conservó congelado en un biostato (Biostat (R), Model 450, Cryogenic Engineering Co., Denver, Colorado, U.S.A.) hasta el momento de procesarlo.

A cada suero se le practicaron las reacciones de hemaglutinación indirecta, fijación del complemento e inmunodifusión en gel de agar. Estas pruebas se realizaron al iniciar el estudio y luego a los 3, 6, 9 y 12 meses después del tratamiento "antiamibiano".

Para las tres pruebas se utilizó antígeno obtenido de cultivos de *E. histolytica*, cepa HKQ (Ameba Antígeno, Axenic Purified, lote T-5132, Parke Davis Co. Detroit, Michigan U.S.A.), preparado de un sobrenadante de amibas lavadas y lisadas por ultrasonificación; el polvo liofilizado representa el equivalente de 0.1 ml., de una solución que contenía  $7 \times 10^6$  amibas por ml., con un contenido total de nitrógeno de 1.86mgs/ml. La restitución del antígeno se hizo con 0.1 ml. de agua bidestilada.

La hemaglutinación indirecta siguió la técnica recomendada por Kessel y cols. (15). En este método se utilizaron glóbulos rojos de carnero al 3% los cuales eran tratados con ácido tánico (E. Merck Darmstadt, Alemania) al 1:100.000 y sensibilizados con el antígeno ya descrito cuya dilución óptima era de 1:80. La dilución del antígeno se hizo con solución tampón de fosfato, pH 6.4. El suero se inactiva a 56°C. durante 30 minutos. Para toda la reacción se utilizó solución tampón de fosfato a un pH de 7.2 al cual se le adicionó albúmina humana (Human Albumin, Parke Davis Co., Detroit, Michigan, U.S.A.), a una dilución final del 3%. La prueba se ejecutó en las placas de microtitulación que se describen en la reacción de fijación de complemento.

La reacción de fijación de complemento CH50, se hizo de acuerdo a la microtécnica cuantitativa adoptada por el Centro

Nacional de Enfermedades comunicables de los Estados Unidos (22) y con las recomendaciones de Kessel y col (15) para el diagnóstico serológico de amibiasis. La dilución óptima del antígeno en esta reacción fué de 1:128. El suero fué inactivado a 60°C, durante 1 hora. Se utilizó suero de cobayo como complemento; que se almacenaba en el biostato con nitrógeno líquido y se titulaba cada vez que se realizaba la reacción. El sistema hemolítico consistió en hemolisina cuyo título usual fué de 1:2.500 y glóbulos rojos de carnero al 2.8%. La solución tampón para todas las diluciones fué el Veronal p.H 7.3-7.4 adicionado de gelatina al 1% (Gelatina alba pulvis, E. Merck, Darmstadt, Alemania). Para la ejecución de la prueba se utilizaron placas de lucita para microtitulación con excavaciones en forma de "U" y asas calibradas de 0.025ml. y 0.050ml. (Cooke Engineering Co., Alexandria, Virginia U.S.A.).

En la prueba de inmunodifusión cruzada en gel de agar se siguió el método descrito por Crowle (23) para el cual se emplearon placas de vidrio de 50x50 mm, con agar Noble, (Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.) al 0.9% en solución salina citrada con pH 6.7% y además fenol al 0.25% para evitar contaminación. En el agar se hizo una excavación central de 3 mm. de diámetro y 6 periféricas de igual tamaño, a una distancia de 4 mm. de la central. En el centro de la preparación se colocó 0.01 ml. del antígeno reconstituido pero sin diluir. En la periferia se pusieron los sueros también sin diluir. La placa se guardó durante 24 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Además de los sueros problema se colocaron también controles positivos y negativos. La lectura se hizo con luz indirecta y en fondo oscuro para observar las bandas de precipitado que indican la positividad de la reacción.

La interpretación de los títulos en las reacciones cuantitativas se hizo de acuerdo a lo propuesto por Thompson y Col. (17), en la siguiente forma:

Hemaglutinación indirecta:

Títulos menores de 1:8 = negativos

Títulos de 1:8 a 1:32 = títulos bajos

Títulos de 1:64 a 1:512 = títulos medianos.

Títulos por encima de 1:512 = títulos altos.

Tabla 1 - Distribución de la población del estudio según la edad y el sexo.

| GRUPOS DE EDAD<br>(años) | HOMBRES |      | MUJERES |      | TOTAL |       |
|--------------------------|---------|------|---------|------|-------|-------|
|                          | No.     | %    | No.     | %    | No.   | %     |
| 10 - 19                  | 22      | 19.5 | 35      | 30.9 | 57    | 50.4  |
| 20 - 29                  | 0       | 0    | 8       | 7.1  | 8     | 7.1   |
| 30 - 39                  | 1       | 0.9  | 23      | 20.3 | 24    | 21.2  |
| 40 - 49                  | 1       | 0.9  | 13      | 11.5 | 14    | 12.4  |
| 50 - 59                  | 0       | 0    | 7       | 6.2  | 7     | 6.2   |
| 60 o mayores             | 2       | 1.8  | 1       | 0.9  | 3     | 2.7   |
| TOTAL                    | 26      | 23.0 | 87      | 77.0 | 113   | 100.0 |

Tabla 2 - Efectividad de la profilaxis después del tratamiento antiamebiano

| ENTAMOEBAS<br>HISTOLYTICAS<br>EN FECALES   | CON DROGA<br>PROFILACTICA |       | CON<br>PLACEBO |       | TOTAL |       |
|--|---------------------------|-------|----------------|-------|-------|-------|
| PERMANENTEMENTE<br>NEGATIVO                | 19                        | 32.8  | 8              | 14.5  | 27    | 23.9  |
| PERSISTENCIA                               | 8                         | 13.8  | 27             | 49.1  | 35    | 31.0  |
| APARICION<br>IRREGULAR EN<br>ALGUN MOMENTO | 31                        | 53.4  | 20             | 36.4  | 51    | 45.1  |
| TOTAL:                                     | 58                        | 100.0 | 55             | 100.0 | 113   | 100.0 |

Fijación del complemento:

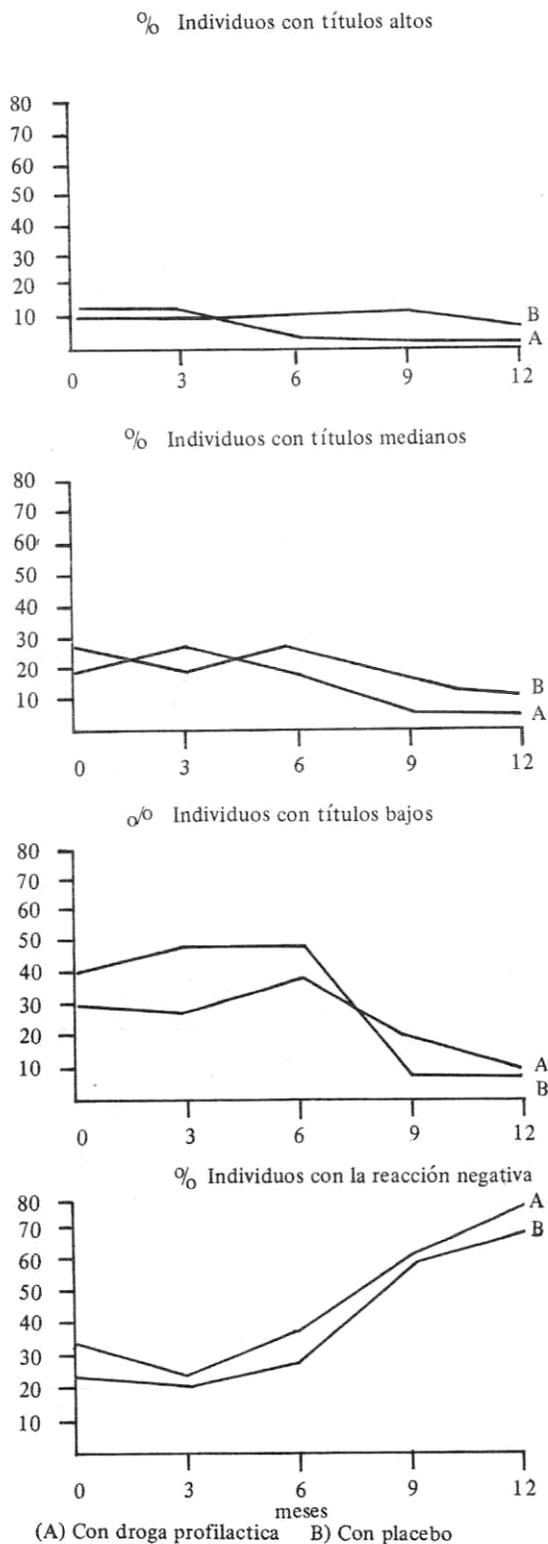
- Títulos menores de 1:8 = negativos
- Títulos de 1:8 a 1:16 = títulos bajos
- Títulos de 1:32 a 1:128 = títulos medianos
- Títulos por encima de 1:128 = títulos altos.

d Tratamiento: Los pacientes recibieron un tratamiento antiamebiano con halquinol (Falmonox (R) Winthrop Products Inc., New York, U.S.A.) a la dosis de 1.500 mg. diarios, durante 3 días (24). Una vez tratados, se dividieron al azar en dos grupos, A y B. El grupo A compuesto por 58 pacientes, recibió permanentemente durante 12 meses, etilclordifene o etofamida (Kitnos R) Cario Erba, Milano, Italia), droga probada como útil para la quimioprofilaxis de la amibiasis

intestinal (25). Estos pacientes recibieron 2 comprimidos de 200 mgs por semana, uno el día lunes y otro el jueves, bajo estricta supervisión. El grupo B integrado por 55 pacientes recibió con la misma frecuencia tabletas de placebo, durante el mismo tiempo.

## RESULTADOS

De las 301 personas mayores de 10 años a las que inicialmente se les buscó *E. histolytica* en sus materias fecales, se encontraron 195 positivas (64.9%). De los individuos parasitados se tomaron 155, pero finalmente el grupo se redujo a 113 pacientes quienes permanecieron durante todo el año del estudio. En la Tabla 1 se muestra la



Gráfica 1. Comportamiento de la reacción de hemaglutinación indirecta en la población estudiada.

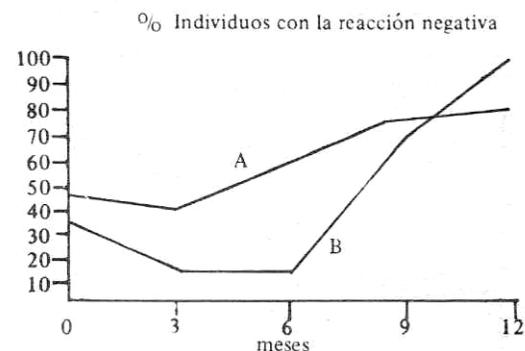
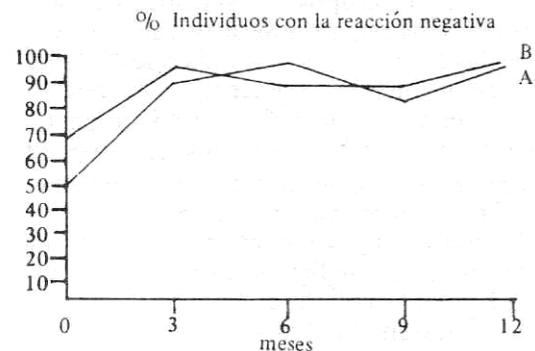
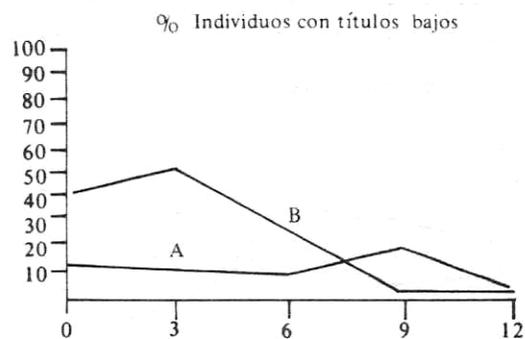
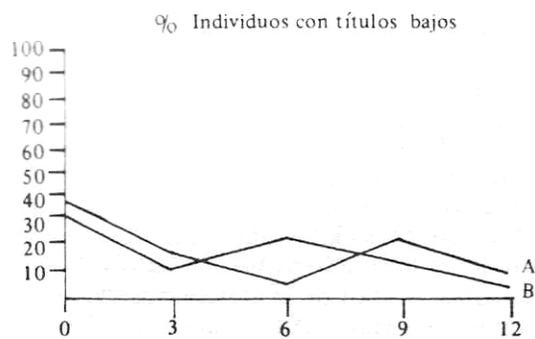
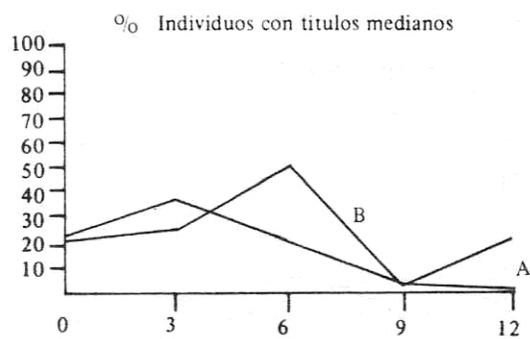
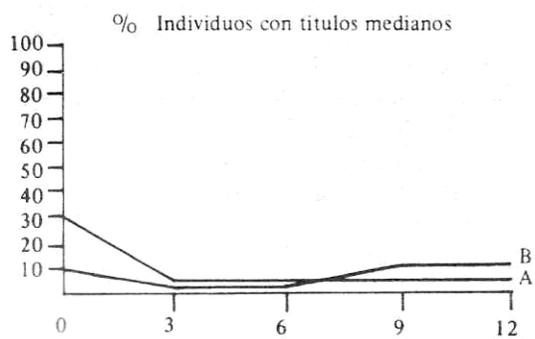
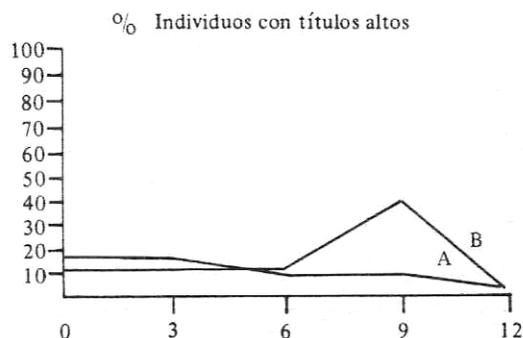
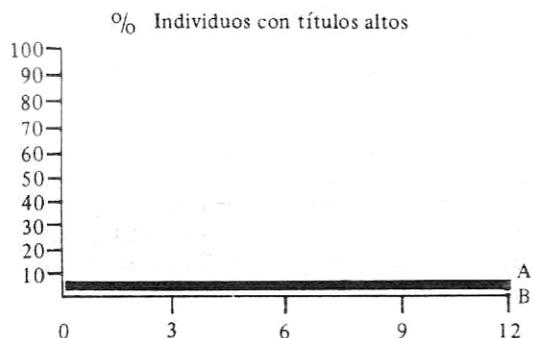
distribución según edad y sexo; el grupo de edad más numeroso fué el de 10 a 19 años (50.4%). La distribución por sexos fué 77% mujeres y 23% hombres.

Al clasificar clínicamente el tipo de amibiasis intestinal que presentaban inicialmente los pacientes, encontramos que el 89.4% eran crónicos, el 6.2% eran portadores asintomáticos y el 4.4 % presentaban amibiasis aguda.

La efectividad de la droga profiláctica después del tratamiento anti-amibiano se muestra en la Tabla 2. De los 58 pacientes que recibieron profilaxis durante un año, el 32.8% permanecieron negativos, mientras que en 13.8% persistió el parásito, y en el 53.4% el parásito desapareció después del tratamiento, pero reapareció irregularmente. En cambio en los 55 pacientes que recibieron el placebo, solo el 14.5% permanecieron sin el parásito durante todo el tiempo; el 49.1% estuvieron parasitados permanentemente y en los demás o sea 36.4% la presencia de la amiba fué irregular. En todos los grupos señalados existieron diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

Al observar el comportamiento de la reacción de hemaglutinación indirecta en la población estudiada (Gráfica 1), se puede ver que las curvas correspondientes a los dos grupos son paralelas y muy cercanas unas de otras, sin separarse en forma significativa. En la parte inferior de la gráfica observamos que antes del tratamiento inicial, el 31% y el 23% de los grupos A y B respectivamente, tuvieron la reacción negativa; si comparamos estas cifras con la obtenida a los 12 meses, vemos que los porcentajes de negativos aumentaron a un 80% y 70% respectivamente; el incremento de los negativos se hizo evidente después de los 6 meses del tratamiento. En el mismo gráfico se observa cómo los individuos que inicialmente tuvieron títulos bajos o medianos, presentaron una curva similar pero a la inversa, es decir que antes del tratamiento existió mayor porcentaje de pacientes con títulos bajos o medianos el cual descendió a partir de los 6 meses.

En aquellos pacientes con títulos altos se presentó descenso, pero no lo suficiente para quedar por debajo de 1:512, por lo



(A) Con droga profiláctica

(B) Con placebo

Gráfica 2- Comportamiento de la reacción de fijación de complemento en la población estudiada.

(A) Con droga profiláctica

(B) Con placebo

Gráfica 3- Comportamiento de la reacción de hemaglutinación en los pacientes sin reaparición de *E. histolytica*.

cual siguieron dentro de la categoría de títulos altos. Esto hizo que el grupo permaneciera estable a lo largo de los 12 meses del estudio, como aparece en la parte superior de la gráfica 1.

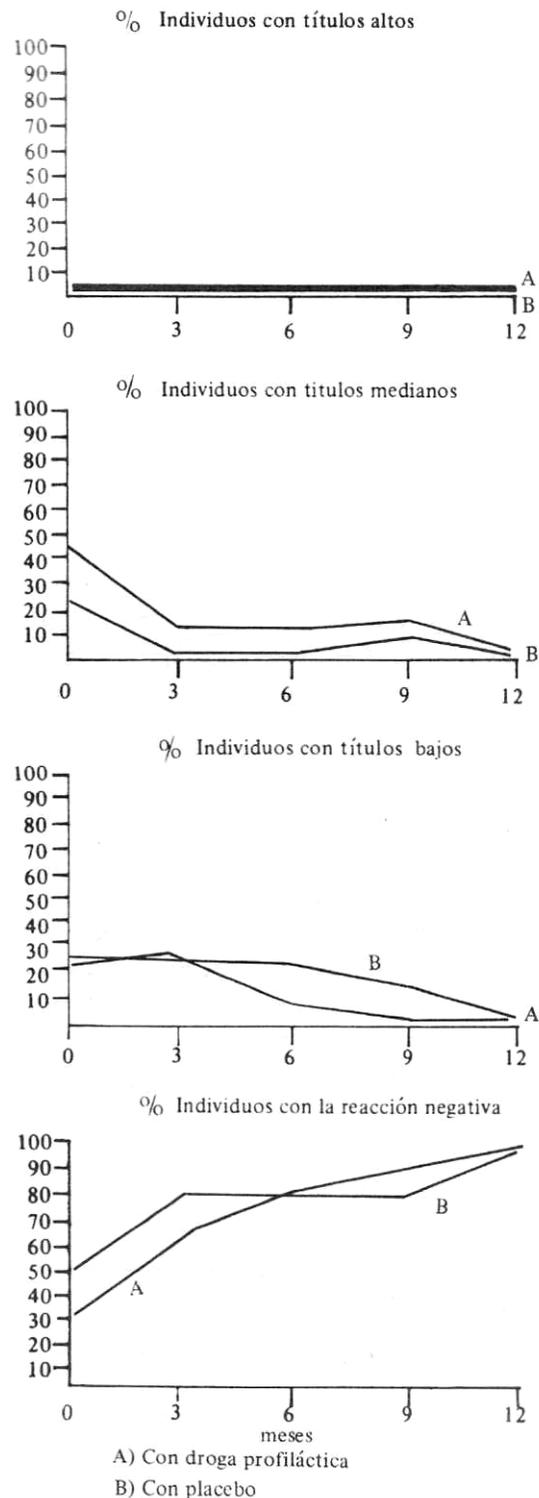
En la gráfica 2 se observa el comportamiento de la reacción de fijación del complemento en la misma población. Puede verse en la parte inferior que existió un mayor número de individuos con esta reacción negativa. Las curvas para el grupo con placebo y profilaxis, se encuentran igualmente paralelas y cercanas entre sí. También se logra ver que los cambios de las reacciones aparecen a partir de los 3 meses de haber recibido el tratamiento. Además se nota en la gráfica superior la ausencia de títulos altos.

Si analizamos separadamente por medio de la hemaglutinación aquellos pacientes en quienes no reapareció la *E. histolytica* después del tratamiento (Gráfica 3), vemos que las curvas cambian un poco, ya que las líneas se separan para luego volverse a juntar al final del año. La parte inferior de la gráfica nos indica que se convierten a negativos mayor número de pacientes con droga profiláctica que con placebo. Cambios similares suceden en los individuos con títulos bajos, medianos y altos cuando reciben la profilaxis. Las diferencias son significativas con una  $p < 0.05$ .

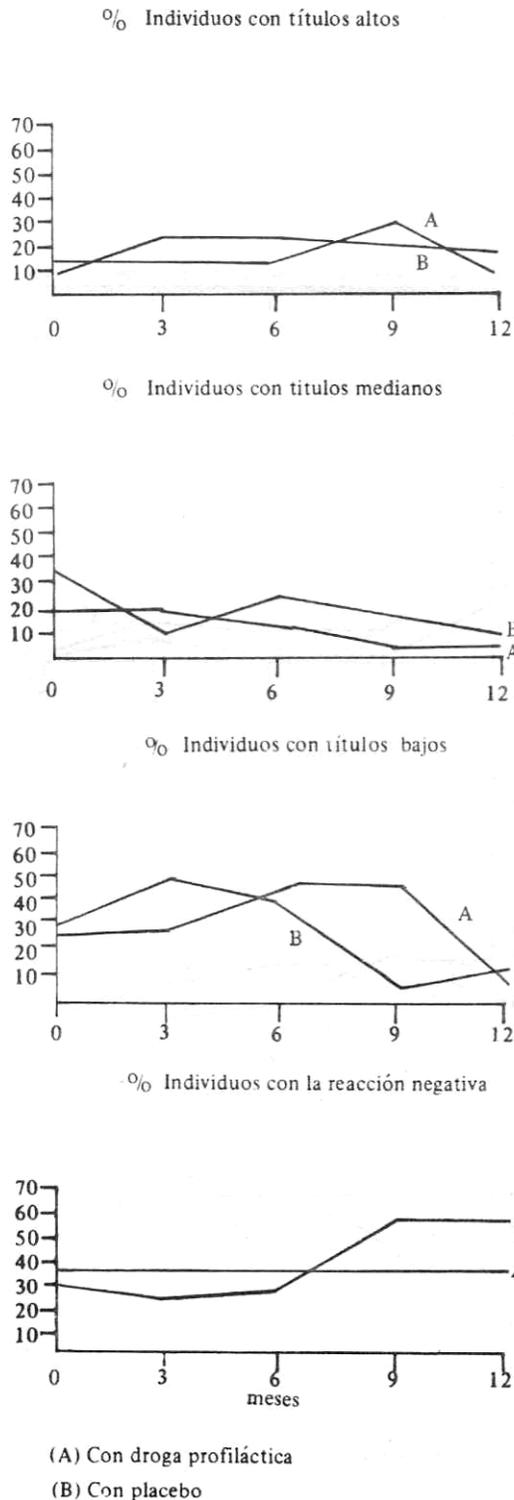
La gráfica 4 presenta los resultados de la reacción de fijación del complemento en los pacientes en los cuales no hubo reaparición de *E. histolytica*. En todo el tiempo no se vieron variaciones notorias entre aquellos con placebo y con profilaxis. Se observa también que no se encontraron individuos con títulos altos en ninguno de los dos grupos.

Finalmente la gráfica 5, muestra el comportamiento de la reacción de hemaglutinación indirecta en aquellos individuos en quienes persistió el parásito después del tratamiento, tanto en quienes recibieron droga profiláctica como en quienes recibieron placebo. Las tendencias de las curvas son similares a las que vimos en el grupo total, aunque sin los cambios después de los 6 meses. Aunque no se ilustra, igual aspecto mostró la reacción de fijación del complemento en este mismo grupo.

En ninguno de los individuos se encon-



Gráfica 4 - Comportamiento de la reacción de fijación de complemento en los pacientes sin la reaparición de *E. histolytica*.



Gráfica 5-Comportamiento de la reacción de hemaglutinación indirecta en los pacientes con persistencia de *E. histolytica*.

tró positiva la inmunodifusión en agar en el estudio inicial, pero 3 pacientes del grupo que recibieron placebo la tuvieron positiva a los tres meses del tratamiento. Esta positividad continuó durante los 12 meses y fué concomitante con la persistencia del parásito. Un cuarto paciente con inmunodifusión positiva perteneció al grupo que recibió profilaxis; en éste, la infección amibiana nunca desapareció y la prueba se hizo positiva a los 12 meses después del tratamiento.

DISCUSION

El concepto inicial sobre las reacciones serológicas en la amibiasis era desfavorable al no encontrarse una estrecha correlación entre la presencia del parásito y la positividad de la prueba. Cuando se comenzó a estudiar la reacción de fijación del complemento, además de tener dificultades en la estandarización del antígeno, se encontraban casos en los cuales la prueba era negativa no obstante observar *E. histolytica* en las materias fecales del paciente.

Actualmente, además de disponer de un buen antígeno, se sabe de las variaciones de patogenicidad de diferentes cepas de *E. histolytica*. Se encuentran amibas que van desde simples comensales hasta altamente invasores. Esto explica que el parásito no está obligatoriamente en los tejidos y por lo tanto el estímulo antigénico es variable. Se observan casos en los cuales la invasión no existe o es mínima y por supuesto no hay anticuerpos detectables por algunas reacciones.

Como la capacidad de producción de anticuerpos depende tanto de las características del antígeno, como de la duración y frecuencia de exposición a él y también de la capacidad del huésped para la respuesta inmune, es necesario para la interpretación de las pruebas serológicas, el conocimiento adecuado de la existencia o no de infección amibiana y del tipo de amibiasis existente, por este motivo llevamos a cabo un tratamiento inicial y se hizo lo posible por mantener un grupo libre de amibiasis mediante el uso de droga profiláctica. Con esto perseguimos controlar la producción de anticuerpos y observar sus variaciones.

Para tratar de eliminar la *E. histolytica* del tubo digestivo de los pacientes, escogimos el halquinol, por ser una droga con la

cual se han conseguido curaciones de la amibiasis intestinal crónica ó asintomática que han variado entre un 73% y 93% con una dosis total de 1.500 a 3.000 mgs. (24). Después de este tratamiento inicial, se pretendió que el grupo A permaneciera sin el parásito durante un año, para lo cual se utilizó una droga anti-amibiana con fines profilácticos. La quimioprofilaxis para la amibiasis intestinal fué iniciada desde 1940 por Craig (26) y repetidamente realizada con nuevas drogas, por diferentes investigadores (24-31) con resultados variados. La droga empleada por nosotros para la profilaxis fué el etilclordifene o etofamida, que corresponde a una sal de la cefamida o clorofenoxamina y que tiene 7 veces más actividad anti-amibiana "in vitro" y 1.8 veces más eficacia en el tratamiento de la amibiasis experimental de la rata (25). Etilclordifene se absorbe por el intestino y ha mostrado gran eficacia en el tratamiento de la amibiasis intestinal crónica (25,32). El éxito obtenido en la profilaxis por Botero y col. (25), nos indujo a utilizar esta droga en nuestro trabajo, aunque la protección del 32.8% obtenida por nosotros no fué tan alta como la observada por otros autores (25,29). No encontramos explicación para la menor eficacia de la droga en relación con los otros informes, ya que empleamos igual dosificación durante 12 meses y realizamos controles parasitológicos igualmente cuidadosos.

Al analizar el comportamiento de las reacciones de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento (Gráficas 1 y 2), vemos que las curvas correspondientes a los grupos con profilaxis y placebo son paralelas y muy cercanas entre sí, indicándonos que ambos grupos presentaron reacciones similares a lo largo de los 12 meses del seguimiento serológico y que la droga profiláctica no alteraba el comportamiento de las reacciones. Pero si comparamos los resultados antes del tratamiento inicial y a los 12 meses, vemos que existen diferencias significativas en sus porcentajes. Para comprender mejor este aspecto observamos lo que sucede en las curvas correspondientes a las reacciones de hemaglutinación negativas (Gráfica 1, parte inferior); antes del tratamiento inicial, el 31 % y el 23% de los grupos A y B respectivamente estaban negativas, a los 12 meses estos mismos grupos subieron al

80% y 70% respectivamente, haciéndose evidente el incremento después de los 6 meses; estos resultados insinúan que dicho tratamiento inicial hizo variar la producción de anticuerpos a partir de los 6 meses.

Igual interpretación tenemos para aquellos que tuvieron las reacciones con títulos bajos y medianos (Gráfica 1), en los cuales se observa el descenso de los títulos de anticuerpos. No sobra advertir que las curvas de las reacciones negativas fueron en ascenso y por lo tanto las otras reacciones positivas fueron disminuyendo. Se observó también una baja en los títulos altos, que no fué lo suficientemente grande para pasarlos al grupo de los títulos medianos. Este hallazgo coincidió con el informe de Krupp (33) en 1970, quien estudió en Cali, Colombia, pacientes amibianos utilizando la hemaglutinación indirecta antes y después del tratamiento. Este trabajo ilustra el comportamiento de los anticuerpos en dos pacientes seguidos después del tratamiento, uno de ellos con un título inicial de 1:5 120 que a los 6 meses bajó a 1:1280 y otro que descendió de 1:2560 a 1:640 en 3 meses. Ambos mostraron un cambio en los títulos pero a pesar de la caída, siguieron dentro de la clasificación de títulos altos. Estos hechos nos indican que para observar un franco descenso de los niveles altos de anticuerpos a títulos medianos o bajos, se necesita más de un año después del tratamiento.

El comportamiento de la reacción de fijación de complemento (Gráfica 2) es similar al de la hemaglutinación indirecta y como era de esperar al ser una reacción menos sensible, se encontró mayor número de individuos con la reacción negativa y ninguna con títulos elevados, pues en realidad se trata de una población portadora de amibas en su intestino y no pacientes con amibiasis extraintestinal en los cuales se observan niveles altos de fijación de complemento. Observaciones semejantes de otros autores (15, 33-38) con las reacciones de hemaglutinación indirecta y fijación del complemento, afirman también que los anticuerpos para *E. histolytica* decrecen lentamente después de un tratamiento exitoso. Para hacer resaltar este concepto los autores mencionan los cambios que ocurren en pacientes con una amibiasis verdaderamente invasiva, como lo es el absceso hepático y cuyos títulos son

inicialmente elevados. Molina y col. (34) afirman que en este tipo de infección los títulos de hemaglutininas no varían durante meses y que algunos sólo bajan a la mitad a los 3 años. Por otro lado Kessel y col. (15) tuvieron la oportunidad de seguir serológicamente varios pacientes y encontraron que 2 llegaron a negativizar la fijación del complemento, uno a los 5 meses y otro a los 23 meses después del tratamiento; en estos casos no se observó descenso de la hemaglutinación. Los mismos autores observaron también en otros 4 pacientes, que el título de hemaglutinación bajó de 1:8000 a 1:2000 y el de fijación del complemento de 1:32 a 1:8 a los 23 meses del tratamiento. Igualmente Krupp y Powell (37) al hacer el seguimiento de pacientes de una zona endémica, tanto en los que padecían amibiasis hepática, como disentería, encontraron que los niveles de anticuerpos decrecieron con el tiempo, pero las pruebas permanecieron positivas en un 90% de los pacientes después de 2 años. En nuestros pacientes que en general presentaban amibiasis poco invasivas, la negativación de las pruebas se hizo en menos tiempo, pero un 20 a 30% de los pacientes continuaban positivos a los 12 meses después del tratamiento.

Una mejor idea acerca de la presencia de anticuerpos después del tratamiento de una infección por *E. histolytica*, nos la da el grupo de pacientes en el cual las amibas no volvieron a aparecer en las materias fecales durante todo el año, tanto en aquellos que recibieron droga profiláctica como en quienes recibieron placebo. (Gráfica 3). La hemaglutinación indirecta se volvió negativa en mayor proporción en los individuos con profilaxis que en los del placebo. Posiblemente la droga profiláctica impidió las reinfecciones en este grupo y por lo tanto el estímulo antigénico fué menor. Esta observación solo fué posible con la reacción de hemaglutinación indirecta, pues la fijación del complemento, por ser menos sensible, no alcanzó a mostrar estos cambios (Gráfica 4).

Cuando el parásito persistió durante todo el tiempo, las curvas de la reacción de hemaglutinación indirecta (Gráfica 5), no

mostraron cambios tan marcados como los observados en aquellos que permanecieron sin amibas (Gráfica 3). Esto es especialmente visible si comparamos las dos gráficas del comportamiento de las reacciones negativas. Igual anotación es aplicable a la reacción de fijación del complemento. Estos hallazgos resultan lógicos al tener en cuenta que la *E. histolytica* nunca desapareció del organismo. La persistencia del antígeno en los tejidos es importante para la continuidad de la respuesta inmune, pues como lo han demostrado varios autores (38-43), los anticuerpos circulantes son evidenciados por un período mayor de 1 ó 2 años y estos títulos comienzan a decrecer varios meses después de la última inyección del antígeno (43). Por este motivo, tanto en el último grupo anotado como en los anteriores, es lógico detectar niveles de anticuerpos, pues con la sola existencia de los antígenos de *E. histolytica* en los tejidos, que son muy variados (35,36,44,45), se determina la producción de anticuerpos, sin ser indispensables la presencia de parásitos en las materias fecales.

En cuanto a la inmunodifusión en agar, es importante aclarar que se trata de una prueba indicativa de amibiasis invasiva (16, 19,37,46) y por lo tanto se espera encontrarla positiva especialmente en la amibiasis extraintestinal y en la aguda. En nuestro estudio aunque no encontramos precipitinas detectadas por este método al iniciar el estudio, sí pudimos observar que los 4 pacientes en quienes apareció la prueba positiva después del tratamiento inicial, correspondían a individuos que tenían una amibiasis aguda antes del tratamiento. Posiblemente estos pacientes no tenían anticuerpos al principio, pero lo formaron posteriormente como consecuencia de la invasión tisular. La baja frecuencia de pruebas positivas con la inmunodifusión está de acuerdo con los hallazgos previos en pacientes con diferentes tipos de amibiasis (20), en los cuales se observó que en la amibiasis crónica las precipitinas sólo estuvieron presentes en el 2.9%. En nuestro estudio tuvieron la prueba positiva en algún momento el 3.5% y es de advertir que el 95.6% eran individuos con amibiasis crónica y portadores asintomáticos. Este bajo porcentaje de positividad no se debe a la presencia del parásito en la luz intestinal, sino a la invasión tisular que su-

cedió en algún momento, como ya lo hemos discutido anteriormente (47). Por estas razones se considera que esta prueba es la que mejor se correlaciona con la enfermedad (15,16,20,33,34), tanto en zonas altamente endémicas (18,37,46,48) como en las de baja endemicidad (49).

Finalmente queremos hacer las siguientes consideraciones derivadas de la presente investigación:

a- Un tratamiento antiamebiano completo modifica los niveles de anticuerpos circulantes.

b- El cambio de las reacciones serológicas por este tratamiento sólo es visible a partir de los 6 meses.

c- La profilaxis antiamebiana por sí sola, no modifica significativamente los niveles de anticuerpos, en un periodo de un año.

d- La quimioprofilaxis solamente es efectiva en porcentaje moderado cuando se correlaciona con la ausencia de parásitos en la luz intestinal.

### SUMMARY

This study involved 113 persons resident in an area endemic for amebiasis and who were positive for *Entamoeba histolytica* by stool examinations. All patients were initially treated with a non-absorbable antiamebic drug and then divided in two groups that received antiamebic chemoprophylaxis or placebo respectively twice a week during one year. Each patient was studied serologically by means of indirect hemagglutination, complement fixation and agar immunodiffusion test at the beginning of the investigation and at intervals of 3,6,9 and 12 months. At the indicated times stool examination for *E. histolytica* were performed by using direct and concentration methods.

The two groups showed a similar serological response before treatment and through the year of the study. Nevertheless, variations were observed in the positivity of these tests when the results obtained at the beginning and at the end of the investigations were compared.

The parasitological follow-up revealed that 32.7% of the patients with prophylactic drug and 14.6% of those with placebo, remained negative for *E. histolytica*. Figure that was statistically significant.

When the serological results were reviewed for the 12 months of the follow-up changes due to the antiamebic treatment observed. These changes started 6 months after initiation of therapy, chemoprophylaxis by itself, did not significantly modify antibody levels.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todo el personal del Centro de Salud No. 19 y muy especialmente a la señorita Astrid Elena Montoya, cuyos esfuerzos lograron una motivación permanente en la comunidad estudiada.

### BIBLIOGRAFIA

- 177" Botero, D., López, F., Cano, H. y Vélez, G.: Amibiasis y Parasitosis intestinal en el Hospital Mental de Antioquia. *Antioquia Med.* 8:431-437, 1.958.
- 2.- Restrepo, M.: Estudio parasitológico de una región del Amazonas Colombiano. *Antioquia Med.* 12: 462-484, 1.962.
- 3.- Duque, J.L. y Zuluaga, H.: Estudio de la amibiasis y otras parasitosis intestinales en relación con el medio familiar y socioeconómico en Santo Domingo (Antioquia). *Antioquia Med.* 12:243-322, 1.962.
- 4.- Parasitismo Intestinal. Estudio de recursos humanos para la salud y educación médica en Colombia. Investigación Nacional de Morbilidad. Ministerio de Salud Pública, Colombia, 1.969.
- 5.- Bravo, C.: Absceso hepático. Estudio de 121 casos comprobados. *Antioquia Med.* 14:681-722. 1.96-
- 6.- Duque, O.: Amibiasis fatal en Colombia. Estudio anatomoclínico de 220 casos y revisión de la literatura Latinoamericana. *Antioquia Med.* 18:783-808. 1.968.
- 7.- Biagi, F. y Beltrán, F.: Amibiasis, un reto a la comprensión de los mecanismos patogénicos. *Gaceta Med. Méx.* 97:71-88, 1.967.
- 8.- Dopter, M.C.: Sensibilisatrice spécifique dysentérique dans le serum des animaux et des malades. *Ann. Inst. Pasteur* 19:753, 1.905.
- 9.- Craig, C.F.: Observation upon the hemolytic, cytolytic and complement binding properties of extracts of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med.* 7:225, 1.927.
- 1077" Craig, C.F.: Complement fixation in the diagnosis of infection with *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med.* 8:29, 1.928.
- 11.- Menendez, P.E.: Serological relationship of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.* 15:785, 1.932.
- 12.- Heathman, L.: Studies of antigenic properties of some free living and pathogenic amebas.- *Am. J. Hyg.* 16:97, 1.972.

- 13.- Rees, C.W., Bozicevich, S., Reardon, L.V. and Jones, F.: A preliminary on the complement fixation test for amoebiasis with antigens prepared from *E. histolytica* grown with a single species of bacteria. *Am. J. Trop. Med.* 22:501, 1.942.
- 14.- Diamond, L.S.: Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*, *Science* 134:336-337, 1.961.
- 15.- Kessel, J.F., Lewis, W.P., Molina-Pasquel, C. and Turner, J. A.: Indirect hemagglutination and complement fixation test in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14:540-550, 1.965.
- 16.- Powell, S.J., Maddison, S. E., Wilmot, A.J. and Elsdon- Dew, R.: Amoebic gel diffusion precipitin test. *Am. J. Med. Hyg.* 17:840, 1.968.
- 17.- Thompson, P.E., Graedel, S.K., Schneider, C.R., Stucki, W.P. and Gordon, R.M.: Preparation and Evaluation of Standardized Amoeba Antigen from Axenic Cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39:349 - 365, 1.968.
- 18.- Maddison, S.E., Powell, S.J. and Elsdon - Dew, R.: Application of serology to the epidemiology of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14:554-597, 1.965.
- 19.- Morris, M.H., Powell, S.J. and Elsdon - Dew, R.: A rapid latex-agglutination test for invasive amoebiasis. *S. African. Med. J.* 44:594-595, 1.970.
- 20.- Restrepo, M., Restrepo, F. y Botero, D.: Reacciones serológicas en pacientes con amebiasis. *Acta Med. Col.* 1:223-228, 1.976. , 1.976.
- 21.- Ritchie, L. S., Pan, C. and Hunter, G. W.: A comparison of the zinc sulfate and the MGL (Formalin-ether) Technics. *J. Parasit.* 38:(Suppl):6, 1.952.
- 22.- U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. (U.S. Public Health Service Publication 1 228).
- 23.- Crowle, A.J.: Immunodiffusion. Academic Press, New York, U. S. A., 1.961.
- 24.- Zuluaga, H., Botero, D., Vélez, H. y Castaño, A.: Estudios terapéuticos y quimioprolifáticos con la droga antiamebiana Win- 13.146. *Antioquia Med.* 21:559-574, 1.971.
- 25.- Botero, D., Rojas, W., Hoyos, D. y Sánchez, M.H.: Estudio epidemiológico, terapéutico y quimioprolifático de amebiasis intestinal en el municipio de Apartadó. *Antioquia Med.* 21:217, 1.971.
- 26.- Graig, C.F.: The medicinal prophylaxis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med.* 20:799-801, 1.940.
- 27.- Beaver, P.C., Jung, R.C., Sherman, H. J., Read, T.R. and Robinson, T.A.: Experimental Chemoprophylaxis of Amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 5:1015-1021, 1.956.
- 28.- De Carneri, I.: A clorofenoxamida como possível quimioprolifático antiamebiano. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2:8-16, 1.960.
- 29.- Rojas, W. y Leiderman, E.: Profilaxis de la amebiasis intestinal con clorofenoxamida. *Antioquia Med.* 15:409-414, 1.965.
- 30.- Biagi, F., López, R., Gonzalez, C. y Gutierrez, M.: Quimioprolifaxis de la amebiasis con cefamida en una comunidad abierta. *Gaceta Med. México* 96: 183-190, 1.966.
- 31.- Zuluaga, H.: Quimioprolifaxis de la Amebiasis intestinal con Win -13.146. *Tribuna Med.* 33:241-245, 1.969.
- 32.- Heggins, D.: Ensaio Clínico con un Now Sal- Etilclordifene no tratamento de Amebiase Intestinal Crônica. *Antioquia. Med.* 19:647-649, 1.969.
- 33.- Krupp, I. M.: Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19:57-62, 1.970.
- 34.- Molina, C., Diaz, A., Rosas, M. y Hernández, J.: Estudio de la reacciones de hemoaglutinación y fijación de complemento en el suero de enfermos de amebiasis. *Rev. Inst. Salud Publ. (Mex).* 28: 313-342, 1.968.
- 35.- Savanat, T. and Chaicumpa, W.: Immunoelectrophoresis Test for Amoebiasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 40:343-353, 1.969.
- 36.- Krupp, I. M. and Powell, S. J.: Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:421-424, 1.971.
- 37.- Krupp, I. M. and Powell, S.J.: Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:414-420, 1.971.
- 38.- Crampton, C.F., Reller, H.H. and Hauowitz, F.: Persistence of C14, Anthranil azo - ovalbumin in Injected Rabbits. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 80: 448-451, 1.952.
- 39.- Crampton, C. F., Reller, H.H. and Hauowitz, F.: Deposition of beef serum gamma - globulin in rabbit organs and subcellular fractions. *J. Immunol.* 71: 319-324, 1.953.

- 40.- Richter, M. and Haurowitz, F.: Continuous Synthesis of antibody after primary immunization with protein antigens. *J. Immunol* 84: 420-425, 1.960.
- 41.- Roberts, A.M. and Haurowitz, F.: Quantitative studies of the Bis Diazotized benzidine method of hemagglutination. - *J. Immunol.*89:348-357, 1962
- 42.- Saha, A0 Garvey, J.S. and Campbell, D.H.: The Physicochemical Characterization of the Ribonucleic Acid - Antigen Complex Persisting in the Liver of Immunized Rabbits.- *Arch. Biochem. Bioph.* 105:179-192, 1.964.
- 43.- Richter, N., Zimmerman, S. and Haurowitz, F.: Relation of antibody titer to persistence of antigen. *J. Immunol.* 94:938-941, 1.965.
- 44.- Krupp, I.M.: Protective Immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*23:355-360, 1.974.
- 45.- Alam, M. and Ahmad, S.: Immunogenicity of entamoeba histolytica antigen fractions. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*68:370-373, 1.974.
- 46.- Vinayak, V. K., Prakash, O., Talwar, G. P., Tandon, B. N. and Mohapatra, L.N.: Evaluation of Gel Diffusion Precipitin Test for Amoebiasis. *Indian."J."Med. Res.*62:1317-1322, 1.974.
- 47.- Auernheimer, A.H., Atchley, F. O. and Wasley, M. A.: Further studies of amebiasis by gel diffusion *J. Parasit.* 52: 950-953, 1.966.
- 48.- Meerovitch, E. and Khan, Z. A.: A Preliminary Report on the Serological Response of Amoebiasis Patients from an Endemic Area in Northwestern Saakatchwan. *Canadian J. Publ. Hlth.*58:270-274, 1.967.
- 49.- Stamm, W.P., Ashley, M. J. and Bell, K : The value of amoebic serology in an area of low endemicity *Trans. Roy. Soc. Trop.Med.Hyg.* 70:49-53. 1.996.