



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" ZARAGOZA "**

**ESTUDIOS SEROLOGICOS DE LA
AMIBIASIS EN COMUNIDADES
MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ESPERANZA CRUZ MEJIA



México, D. F.

Agosto de 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CONTENIDO

1. RESUMEN
2. INTRODUCCION
 - 2.1 Fundamentación de la elección del tema
 - 2.2 Propiedades de la IgG e IgM
 - 2.3 Fundamentos de las técnicas de CIE y ELISA
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. OBJETIVOS
5. HIPOTESIS
6. MATERIAL Y METODOS
 - 6.1 Materiales
 - 6.2 Métodos
7. RESULTADOS
8. DISCUSION
9. CONCLUSIONES
10. BIBLIOGRAFIA

1. RESUMEN

Se estandarizó la técnica de análisis inmunoenzimático (ELISA) para estudiar los niveles de IgG e IgM específicos en 37 sueros de pacientes adultos y de dos niños con diagnóstico confirmado de absceso hepático amibiano, con tiempo de evolución entre una y tres semanas. Asimismo se estudiaron 197 sueros de adultos voluntarios aparentemente sanos. Por otro lado se analizó una pequeña muestra de la población de Cadereyta Qro. dividiéndose ésta en dos grupos: a) Serológicos positivos y b) Coproparasitoscópicos positivos. En todas las muestras se realizó simultáneamente contraelectroforesis (CIE). El análisis de los resultados de la ELISA demostró que aunque existió una amplia distribución de los niveles de IgG específicos en sujetos enfermos, sí fué posible diferenciarlos claramente de los observados en los sujetos sanos. La sensibilidad de la prueba de ELISA fué de 92.30%, especificidad de 96.95%, valor predictivo positivo (V.P.+) 87.71%, valor predictivo negativo (V.P. -) 98.45% y eficiencia de 96.18%. Por el contrario los niveles de la IgM fueron muy semejantes en ambos grupos. La CIE tuvo sensibilidad de 92.30%, especificidad de 99.49%, valor predictivo positivo 97.29%, valor predictivo negativo de 98.45% y eficiencia de 98.30%. Con respecto a la muestra poblacional de Cadereyta, se encontró que no existió relación alguna entre ambos grupos, pero sí fué posible distinguir que predominaron más las mujeres que los hombres, en una proporción de 1 a 5 y 1 a 3 respectivamente.

2. I N T R O D U C C I O N

La amibiasis, infección producida por Entamoeba histolytica es una enfermedad que existe practicamente en todos los países - del mundo, principalmente en aquellos que mantienen condiciones sanitarias deficientes y en donde además, representa un importante problema de salud pública. (1, 2, 3)

Las formas asintomáticas predominan en los climas templados mientras que en las regiones tropicales se encuentran las formas más severas de la enfermedad (2, 3) Se considera que el 10% de la población mundial está infectada con Entamoeba histolytica y - que el 15% de los individuos infectados sufren de amibiasis sintomática (4).

En los países poco desarrollados, la severidad del problema es aún mayor. En el año de 1974 en México, por estudios seroepidemiológicos, se encontró que el 6% de los sujetos aparentemente sanos estaban o habían estado recientemente infectados por Entamoeba histolytica . (5)

Una estimación reciente mundial indica que en el año de -- de 1981, 480 millones de personas eran portadoras de E. histolytica aunque sólo alrededor del 10% de estos desarrollaron amibiasis invasora en la forma de disentería o absceso hepático. De este modo se considera que cerca de 48 millones de personas presentan invasión en la mucosa intestinal o absceso hepático.

En México, la frecuencia de absceso hepático amibiano es - muy alta (6, 7) y se ha encontrado aproximadamente en un 2% de todos los pacientes adultos y de un 3 a 4 % de las autopsias rea

lizadas en hospitales generales, siendo más frecuente en el hombre que en la mujer con una proporción de 3 a 1 (8).

La amibiasis intestinal puede ser benigna o adquirir formas severas. Las formas benignas que se presentan como diarrea aguda y disentería ocurren más frecuentemente en niños, en quienes Entamoeba histolytica es el agente etiológico del 2 al 14% de los casos (9). Las formas severas son: a) colitis amibiana fulminante, b) ameboma del cólon y c) apendicitis amibiana; las cuales presentan una tasa de mortalidad que varía del 20 al 54%. En México estas formas de amibiasis colónica se ven con una frecuencia 10 veces menor que las de absceso hepático amibiano. (10)

Es probable que la amibiasis invasora produzca anualmente de 40,000 a 110,000 muertes en el mundo. Así, después de la malaria, la amibiasis ocupa el segundo lugar en muertes causadas por parásitos.

2.1 Fundamentación de la elección del tema.

Tradicionalmente el método para el diagnóstico de la amibiasis ha sido la identificación de la Entamoeba histolytica mediante el exámen coproparasitoscópico. Aunque la identificación del parásito en las heces del paciente establece el diagnóstico de la amibiasis, la ausencia de dicho organismo no descarta necesariamente la enfermedad. Además, ha sido demostrado que aún con personal experto existe hasta un 30% de error en la identificación del parásito, lo que probablemente ha llevado a sobrediagnosticar la enfermedad.

En años recientes se han ensayado numerosas pruebas serológicas como auxiliares en el diagnóstico de amibiasis tales como: fijación de complemento (11), precipitación (12), fagocitosis de la bentonita (13), floculación de la bentonita (14), difusión en gel (15), inmunolectroforesis (16), aglutinación de latex (17), hemaglutinación indirecta (18), fluorescencia indirecta (19) y más recientemente la ELISA (20).

Todos estos procedimientos se basan en la identificación de anticuerpos específicos circulantes que se detectan generalmente una semana después del inicio de los síntomas. Aunque las diversas pruebas serológicas detectan diferentes tipos de anticuerpos, en el caso de la amibiasis, la mayoría de ellos se encuentran en la fracción IgG subclase 2 (21, 22, 23).

Dentro de las pruebas serológicas clasificadas como de alta sensibilidad tenemos inhibición de la hemaglutinación, en las de moderada está la precipitación y en las de baja sensibilidad, fijación de complemento e inmovilización.

La identificación de anticuerpos tiene dos aplicaciones prácticas:

- 1) El diagnóstico de la amibiasis invasora.
- 2) La seroepidemiología de la infección amibiana.

La utilidad diagnóstica en la detección de anticuerpos, se basa en que dichos anticuerpos se encuentran en más del 90% de pacientes con absceso hepático amibiano y en el 75% de los casos de amibiasis invasora colónica. En áreas de elevada endemicidad los anticuerpos contra Entamoeba histolytica se identifican sólo en -

un pequeño porcentaje de la población de portadores asintomáticos (6.6%) (24).

La utilidad en la detección de anticuerpos contra E. histolytica en la seroepidemiología de la infección amibiana se basa en la persistencia de los anticuerpos séricos en pacientes que sufrieron amibiasis invasora y probablemente también después de infecciones amibianas subclínicas.

El % de detección de anticuerpos es un índice de la prevalencia de la enfermedad, mientras que la magnitud de la infección en una población, se puede estimar por la prevalencia de portadores asintomáticos de quistes, índice que además mide la transmisión de la enfermedad (25). Por lo tanto, consideramos que el utilizar las técnicas de CIE y ELISA para estudios seroepidemiológicos de la amibiasis, representan una herramienta metodológica de gran valor.

2.2 Propiedades de la IgG e IgM

	IgG	IgM
Clase de cadenas H	1	u
Subclase de cadenas H	1, 2, 3, 4	u1, u2
Tipo de cadenas L	k y l	k y l
Peso molecular	150,000	900,000
Fijación de complemento (clásica)	+	++++
Transferencia placentaria	+	0

2.3 Fundamento de las técnicas empleadas.

2.3.1 ELISA

El principio básico de esta prueba es que el antígeno se adhiere a un soporte en donde se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, poniéndose ésta de manifiesto mediante una reacción enzimática.

2.3.2 CIE

El principio básico del método implica la electroforesis en un medio de gel del antígeno y del anticuerpo en direcciones opuestas de manera simultánea a partir de pozos separados con la precipitación resultante en un punto intermedio a sus orígenes.

3. P L A N T E A M I E N T O
D E L P R O B L E M A

Debido a la elevada morbilidad y mortalidad causada por Entamoeba histolytica es necesario disponer de mejores métodos de diagnóstico y tratamiento así como mejorar las estrategias para su control y prevención. El presente trabajo está orientado a la detección de anticuerpos contra Entamoeba histolytica - por las técnicas de CIE y ELISA para aplicarlas en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico de absceso hepático amibiano.

4. O B J E T I V O S

- 4.1 Elaborar los reactivos para el desarrollo de las técnicas de CIE y ELISA.
- 4.2 Desarrollar la técnica de CIE para la detección de anticuerpos séricos contra Entamoeba histolytica.
- 4.3 Estandarizar la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos séricos de tipo IgG e IgM específicos.
- 4.4 Aplicar la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos séricos de tipo IgG e IgM contra Entamoeba histolytica en una población de sujetos con absceso hepático amibiano, sujetos portadores de quistes, sujetos no portadores e individuos donadores de sangre (voluntarios).
- 4.5 Analizar y comparar la utilidad diagnóstica de las técnicas de CIE y ELISA a través de los siguientes parámetros sensibilidad, especificidad, V.P. +, V.P. - y eficiencia.

5. H I P O T E S I S

Tomando en cuenta las condiciones ambientales de las comunidades estudiadas, se encontrará una elevada seropositividad como índice de amibiasis invasora.

Debido a que la técnica de ELISA tiene una alta sensibilidad será útil para el diagnóstico de las diversas formas de amibiasis.

6. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

6.1 MATERIALES

6.1.1 Material Biológico

a) Sueros Positivos. Se estudiaron 37 sueros de pacientes adultos y 2 niños con diagnóstico de absceso hepático amibiano confirmado por datos clínicos de gabinete y en algunos casos por intervención quirúrgica con un tiempo de evolución entre 1 y 3 semanas.

b) Sueros Testigos. Se estudiaron 197 sueros de sujetos adultos, aparentemente sanos, que acuden como donadores profesionales de sangre al Centro Médico Nacional del IMSS.

c) Muestras para Estudios Seroepidemiológicos. Se estudiaron 73 sueros de la población de Cadereyta, Qro., los cuales se dividieron en dos grupos:

Grupo I: Sujetos con serología positiva (CIE previamente reportada como positiva para anticuerpos contra E. histolytica).

Grupo II: Sujetos con examen coproparasitoscópico positivo (presencia de quistes en materia fecal).

d) Antígeno. Se utilizó antígeno obtenido de Enta-moeba histolytica cepa HM 3 en cultivo axénico*.

6.1.2 Equipo

- Espectrofotómetro Coleman modelo 6A
- Baño de temperatura constante modelo Blue M
- Colorímetro Titertek multiscan, Flow Lab.
- Fuente de poder: Titan Power Supply. Laboratorios Helena. Modelo 1500
- Cámara electroforética. Laboratorios Helena
- Lavador automático para sistemas ELISA. Modelo 1250 Cordis Lab.
- Potenciómetro Internacional Científica S.A. Modelo E 510

6.1.3 Reactivos analíticos.

- Tween 20 (polioxietilensorbitan), Sigma U.S.A.
- Albumina bovina, libre de ácidos grasos y de inmunoglobulinas, Sigma
- H₂O₂ 3%, Merck
- Conjugados: anti IgG humana específica de cadenas acoplada a peroxidasa y anti IgM humana específica de cadenas u acoplada a peroxidasa
- Peroxidasa tipo VI, Sigma
- Agarosa para uso en electroforesis tipo II: Medium EEO, Sigma
- Ácido cítrico, Baker & Adamson
- Carbonato de sodio anhidro, Merck
- ortofenilendiamina, Sigma

- Bicarbonato de sodio, Monterrey
- Fosfato de potasio monobásico, Baker
- Cloruro de sodio, Merck
- Cloruro de potasio, Monterrey
- H₂SO₄, Monterrey
- Fosfato de sodio dibásico, Baker

6.2 METODOS

6.2.1 Preparación del antígeno.

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica se cultivan axénicamente en botellas de vidrio de 125 ml, que contienen 100 ml de medio TYIS-33 (30).

El paquete celular se obtiene por centrifugación a 1800 RPM durante 10 min, se elimina el medio de cultivo y el paquete celular se lava con solución de fosfatos (PBS) de 3 a 4 veces (esto se realiza con el objeto de quitar los restos del medio de cultivo).

Una vez que se mide el paquete celular, por cada ml de este se adicionan 5 ml de agua estéril, después se mete a sonicar durante 30 seg, pasado este tiempo se observa al microscópio la ruptura de los trofozoítos.

Finalmente se centrifuga a 10,000 RPM durante 1 hora y el sobrenadante se separa siendo éste último nuestro antígeno y al cual se le determinan proteínas utilizando el método de Lowry (26).

* Cultivo axénico

REACTIVOS	CANTIDAD
Tripticasa	2.00 g
Extracto de levadura	1.00 g
Glucosa	1.00 g
NaCl	200 mg
Fosfato de potasio monobásico	60 mg
Fosfato de potasio dibásico anhidro	100 mg
L cisteína hidrociorada	100 mg
Acido L ascórbico	20 mg
Citrato ferrico de amonio	2.28 mg
H ₂ O estéril	87 ml

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1 N filtrar al vacío y esterilizar en autoclave durante 15 min.

6.2.2 Técnica de CIE

Se utilizan placas de plástico de 8.1 por 2.5 cm cubiertas con 3.5 ml de solución de agarosa al 1.5% con amortiguador de veronal 0.05M y pH de 8.2.

Se hacen en las placas del gel líneas paralelas de pozos de 3 mm de diámetro con una distancia de 4 mm entre los mismos.

(fig. 1) (Figuras, tablas y gráficas anexas al final de resultados).

En el pozo del lado del ánodo se depositan 5 μ l del suero - problema y en el pozo del lado del cátodo 5 μ l de la solución del antígeno amibiano. Se espera a que se reabsorban y se realiza -

una segunda aplicación en la misma cantidad tanto del antígeno como del suero. La concentración del antígeno que se utiliza es de 2.6 µg/ul.

Se usa una cámara electroforética común con el mismo -- amortiguador de veronal, empleando esponjas para hacer el contacto entre el gel y el amortiguador (fig. 2) y se aplica corriente constante de 100 volts por placa durante 45 min.

La mayor parte de las veces, las líneas de precipitación son claramente visibles al término de la CIE (fig. 3). Sin embargo, reacciones débilmente positivas se hacen aparentes dejando reposar las placas en una cámara húmeda y observando al otro día las bandas de precipitación.

6.2.3 Técnica de ELISA

En este sistema se requiere de: (fig. 4)

- Fase sólida

Se emplean esferas de poliestireno de 5 mm de diámetro, a las cuales se les adsorbe el antígeno en amortiguador de bicarbonatos 0.05M y pH de 9.6 por incubación a 10°C durante 18 horas sin agitación.

A continuación las esferas se lavan 6 veces con amortiguador de fosfatos conteniendo 0.05% de Tween 20 (PBS-Tw) y se colocan en una solución de albúmina conteniendo 2 mg/ml en - buffer de bicarbonatos 0.05M y pH de 9.6 y se dejan incubando 2 horas a 10°C, esto es con el objeto de recubrir los sitios que hayan quedado libres y por lo tanto evitar las reacciones inespecíficas, también llamadas reacciones de fondo ó ruido de

la prueba.

Después de este tiempo dichas esferas se lavan 6 veces con PBS-Tw se secan al aire almacenándolas en un frasco conteniendo sílica gel.

- Preparación del conjugado. (peroxidasa anti IgG ó anti IgM)

A 4 mg de peroxidasa se añaden 200 μ l de peryodato de sodio 0.1 M recién preparado, agitando suavemente para evitar la formación de espumas durante 20 min. Al adicionar el peryodato la solución debe cambiar de color dorado a verde, si esto no ocurre, preparar nuevamente el peryodato.

La mezcla se dializa contra buffer de acetato de sodio - 1 mM y pH de 4.4 por 18 horas a 4°C.

A la solución anterior se le aumenta el pH a 9.6 con - buffer de bicarbonatos 0.2 M y se adicionan 10 mg de anti IgG ó anti IgM, agitando durante 2 horas a 4°C. Dializar contra - PBS.

La identidad de la IgG e IgM del conjugado se comprueba por inmunodifusión contra antisueros anti IgG y anti IgM.

Para comprobar que el conjugado no se pegue a las esferas y por lo tanto nos de falsos positivos, se efectúa la siguiente metodología:

Colocar 500 μ l de conjugado anti IgG ó anti IgM unido a peroxidasa.

Incubar a 37° 30 min con agitación.

Lavar 6 veces con PBS-Tw

Cambiar de vial

Adicionar 1 ml de substrato ortofenilendiamina (OPD).

Incubar a 37°C 30 minutos con agitación.

Adicionar 100 μ l de H₂SO₄ 6M!

Leer a 492 nm.

- Diluyente para muestras.

Solución de PBS pH 7.2-7.4, conteniendo albumina bovina y Tween 20 al 0.05%.

- Substrato.

Solución de ortofenilendiamina en buffer de citratos/fosfatos y pH de 5 conteniendo H₂O₂ al 3%. Por cada ml de OPD adicionar 4 μ l de H₂O₂ al 3%.

La reacción se detiene con 100 μ l de H₂SO₄ 6M.

- Determinación de anticuerpos por el método de ELISA.

La metodología que se emplea para realizar una ELISA es la siguiente: (fig. 5)

Diluir el suero 1 a 400 de la siguiente manera:

2 ml de diluyente + 5 μ l del suero por estudiar + 1 esfera sensibilizada con antígeno de Entamoeba histolytica (1 μ g por esfera).

Incubar a 37°C durante 30 minutos con agitación

Lavar 6 veces con PBS-Tw.

Agregar 500 μ l del conjugado anti IgG ó anti IgM.

Incubar a 37 °C durante 30 minutos con agitación.

Lavar 6 veces con PBS-Tw.

Cambiar de vial.

Adicionar 1 ml de sustrato OPD (por cada ml de OPD, colocar 4 ul de H_2O_2 al 3%).

Incubar a 37 °C durante 15 minutos con agitación.

Agregar 100 μ l de H_2SO_4 6 M.

Leer a 492 nm, colocando 250 ul en cada pozo de la placa de microtitulación empleando como blanco OPD.

- Evaluación Inter e intraensayo

Para el intraensayo se escogen 5 sueros: 2 positivos y 3 negativos, realizar la ELISA a cada uno de ellos 5 veces el mismo día. A continuación se calcula la media de las densidades ópticas y finalmente el coeficiente de variación.

En la evaluación interensayo se realiza la ELISA a los mismos 5 sueros antes citados, sólo que a los días 1, 2, 3, 4 y 5, calculando posteriormente la media de las densidades ópticas y el coeficiente de variación.

6.2.4 Métodos Estadísticos

Sueros	+	-	Totales
Absceso hepático	a	b	c
Sanos	d	e	f
Totales	g	h	i

Sensibilidad

Indica la frecuencia de los resultados de pruebas positivas en pacientes con una enfermedad en particular a/c (100).

Especificidad

Indica la frecuencia de los resultados de pruebas negativas en pacientes sin la enfermedad e/f (100).

V. P. (+)

Indica la frecuencia de la enfermedad en todos los pacientes con resultados positivos en la prueba a/g (100).

V. P. (-)

Indica la frecuencia de pacientes no enfermos de todos los pacientes con resultados negativos en la prueba e/h (100).

Eficiencia

Indica el % de pacientes correctamente clasificados como enfermos y no enfermos por la prueba (a + e/i) (100).

7. RESULTADOS

Sensibilización de la fase sólida

Se revistieron las esferas de poliestireno a distintas concentraciones de antígeno de Entamoeba histolytica (medido como proteínas totales); 500 y 50 ng; 40, 10 y 1 µg por esfera. La concentración más adecuada fue la de 1 µg por esfera, ya que concentraciones mayores no aumentaron la sensibilidad del método y a concentraciones mayores el color desarrollado fue muy bajo impidiendo la diferenciación entre las muestras positivas y negativas, aún disminuyendo la dilución del conjugado.

También se utilizaron esferas sin antígeno sometidas sólo a tratamiento con buffer de HCO_3/CO_3 , pH 9.6 y 0.05 M, para verificar que no exista unión inespecífica del conjugado - anti IgG ó Anti IgM a la superficie de la esfera. En este caso y después de someter la esfera a todo el procedimiento normal de la ELISA, se obtuvieron densidades ópticas menores de -- 0.005, lo cual demostró que el conjugado no se une inespecíficamente.

Dilución óptima del conjugado

a) Detección de IgG

La dilución óptima del conjugado se probó utilizando esferas revestidas con 200 y 20 ng, 1 y 40 µg de IgG a distintas diluciones del conjugado; 1 a 500, 1 a 1000, 1 a 2000 y .

1 a 400. Se seleccionó la dilución 1 a 2000 del conjugado que nos proporcionó una densidad óptica de 1.0 con las esferas sensibilizadas a una concentración de 20 ng de IgG.

b) Detección de IgM

En el caso de la IgM el conjugado anti IgM se probó -- empleando esferas recubiertas a las siguientes concentraciones: 40, 20, 1 μ g y 200, 100, 50, 20 ng de IgM, pero como no se observó desarrollo de color se cambió a otra fase sólida. Se utilizaron pozos de poliestireno (Immulon I) revestidos con 500, 100, 50 y 20 ng de IgM y nuevamente no hubo desarrollo de color. Finalmente se revistieron pozos de poliestireno (Immulon II) con 100, 50 y 20 ng por esfera, logrando una densidad óptica de 1.0 a ésta última concentración y con una dilución del conjugado 1 a 1500, lo cual demostró que la IgM sólo se adsorbió al poliestireno llamado Immulon II.

Preservación del conjugado

Se estudiaron varios métodos para la preservación del conjugado:

a) Biofilización

Se realizó una dilución 1 a 2000 del conjugado anti IgG y se congeló a -170°C en presencia de nitrógeno líquido, pasando posteriormente a la liofilizadora. Al reconstituir el conjugado con agua destilada y realizar la prueba ELISA, se probó que la actividad se perdió.

b) Congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Se hizo una dilución 1 a 2000 y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -- observando disminución en la actividad en unos cuantos días posteriores a su empleo.

c) Congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

En este caso se probó almacenar los conjugados a una dilución menor 1 a 20 para el de anti IgG y 1 a 15 para el de anti IgM. Inmediatamente antes de la ELISA se descongelaron y se diluyeron 100 veces con PBS-BSA-Tw, para obtener una dilución final de 1 a 2000 y 1 a 1500 respectivamente. En esta forma su actividad no se vió afectada aún después de 4 meses.

Purificación y preservación del sustrato

Con el objeto de eliminar el mayor número de impurezas presentes en el OPD, se intentó purificarlo por el método de sublimación. Sin embargo no se vió ninguna diferencia notable en los resultados antes y después de purificarlo, por lo que se siguió empleando en su estado inicial.

Aunque el sustrato es fotosensible, su oxidación ocurre en el transcurso de varias horas, por lo que el manejo de este reactivo a la luz ambiente, no afecta en nada a los resultados.

Diluciones del suero

Se probaron distintas diluciones del suero en PBS-BSA-Tw: 1 a 25, 1 a 50, 1 a 100, 1 a 200 y 1 a 400, como se ve en la tabla 1. La dilución que logró diferenciar entre sueros posi-

tivos y negativos fue de 1 a 400.

Tiempos de Incubación

Se realizaron ensayos a distintos tiempos de incubación a temperatura de 37 °C; 5, 15, 30 y 60 minutos. Los mejores resultados fueron a los 15 minutos para los sueros positivos y negativos.

Lavado de Esferas

Se comprobó que el empleo de agua potable, para el lavado de esferas, podía sustituirse por el PBS-Tw, siempre y cuando el pH del agua se mantuviera aproximadamente en 7. Sin embargo, para evitar variaciones en los resultados se siguió utilizando PBS-Tw.

Pruebas de Evaluación Inter e Intra Ensayo

Como se observa en las tablas 2 y 3, las pruebas de inter e intraensayo mostraron coeficientes de variación de 5.16 y 8.16 para los sueros positivos y negativos y 5.12 y 8.20 respectivamente, los cuales son bastante aceptables ya que en la literatura el rango estipulado para este sistema oscila entre 5 y 10%.

Pacientes con Absceso Hepático Amibiano Contra Sujetos Controles

Se realizó una curva de distribución haciendo una gráfica de frecuencia relativa en % contra densidad óptica, para los niveles de IgG en la población de sujetos sanos y enfermos (gráfica 1) y se tomaron varios puntos de corte como se ilus

tra en la tabla 4. El valor de corte más aceptado es el de - 0.400 unidades de densidad óptica obteniendo así para la prueba ELISA sensibilidad de 92.30%, especificidad 96.95%, V.P + 85.71%, V.P. - 98.45% y eficiencia de 96.18%.

La CIE tuvo una sensibilidad de 92.30%, especificidad 99.49%, V. P. + 97.29%, V.P. - 98.45% y eficiencia de 98.30% - (tablas 5 y 6 respectivamente).

La distribución de los niveles de IgM fué muy semejante en los sujetos con absceso hepático amibiano y en la población de los individuos sanos, como se observa en la gráfica 2.

Con el objeto de ver si existía alguna relación entre los valores de ELISA y otros parámetros, los datos se agruparon - por sexo, edad, días de evolución previos a la toma de muestra y evento final (mejoría ó muerte).

En la población de los pacientes con absceso hepático amibiano predominaron más los hombres que las mujeres en una proporción 1 a 8. En los adultos las edades fluctuaron de los 19 a 79 años en el caso de los hombres y de 18 a 34 años en las mujeres y dos niños estudiados (una niña y un niño) con edades de 6 y 7 años respectivamente. En la población de sujetos aparentemente sanos la edad varió entre 18 a 45 años y predominaron más los hombres.

Tomando el tiempo de evolución previo a la toma de muestra es decir, los días de evolución de la enfermedad, la mayoría de los datos se encuentra dentro del rango de 7 a 14 días (gráfica 3) con valores extremos de 1 a 4 semanas.

Estudios seroepidemiológicos en una muestra de la población de Cadereyta Qro.

Se elaboró una gráfica de densidad óptica contra los grupos I y II.

En cuanto al grupo I tenemos que el número de muestras - fué de 42 de las cuales 19 dieron la prueba positiva de ELISA - para IgG (45.23%) y solamente 13 dieron la CIE positiva --- (30.95%).

En el grupo II, el número de muestras fué de 31, de los - cuales 18 son niños con edades entre 1 y 13 años. Solamente 4 - dieron la prueba positiva de ELISA para IgG y 1 la prueba positiva para CIE. Dos de los 4 anteriores son niños de 2 y 4 años respectivamente.

Cabe mencionar que sólo un niño cae dentro de ambos grupos.

Estos grupos también se clasificaron por sexo, siendo más frecuentes las mujeres que los hombres en una proporción de - 1 a 5 para el grupo I y 1 a 3 para el grupo II.

PLACA PARA CIE

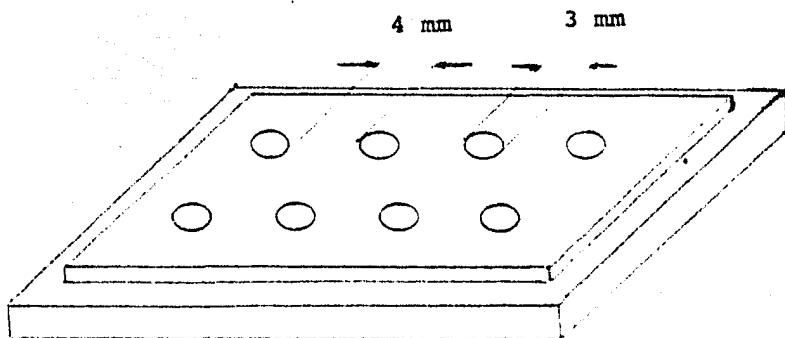


Fig. 1 En este esquema, se representan las distancias entre los pozos y el diámetro de los mismos.

FUENTE DE PODER Y CAMARA ELECTROFORETICA

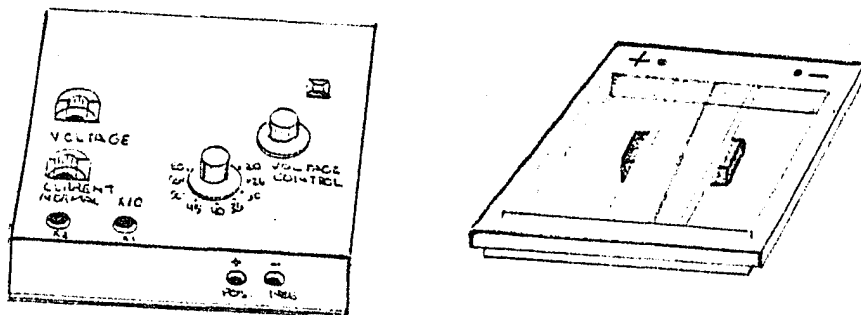


Fig. 2 La cámara electroforética muestra la posición de las esponjas, para hacer el contacto de la placa con la solución amortiguadora.

ESQUEMA DE LA TECNICA DE CIE

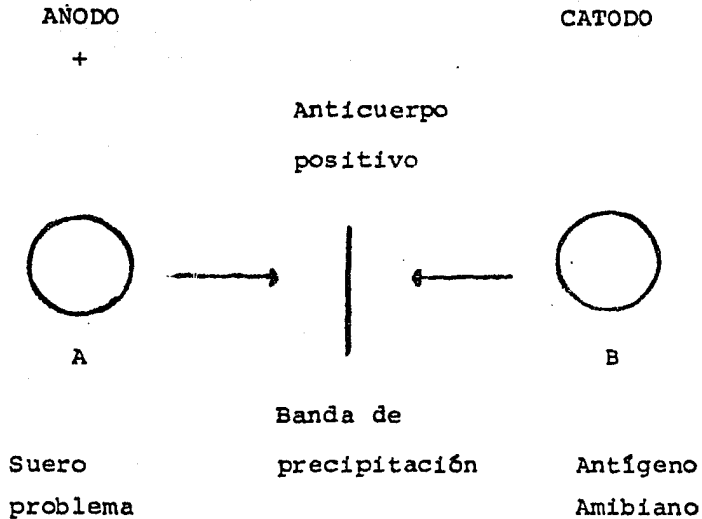


Fig. 3

Esquema de la técnica de CIE para la investigación del anticuerpo antiámibiano. Las flechas indican el desplazamiento de los reactivos por la corriente electroforética.

El suero problema se coloca en el orificio A. El antígeno obtenido del cultivo axénico de Entamoeba histolytica se coloca en el orificio B.

DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL FUNDAMENTO
DE ELISA

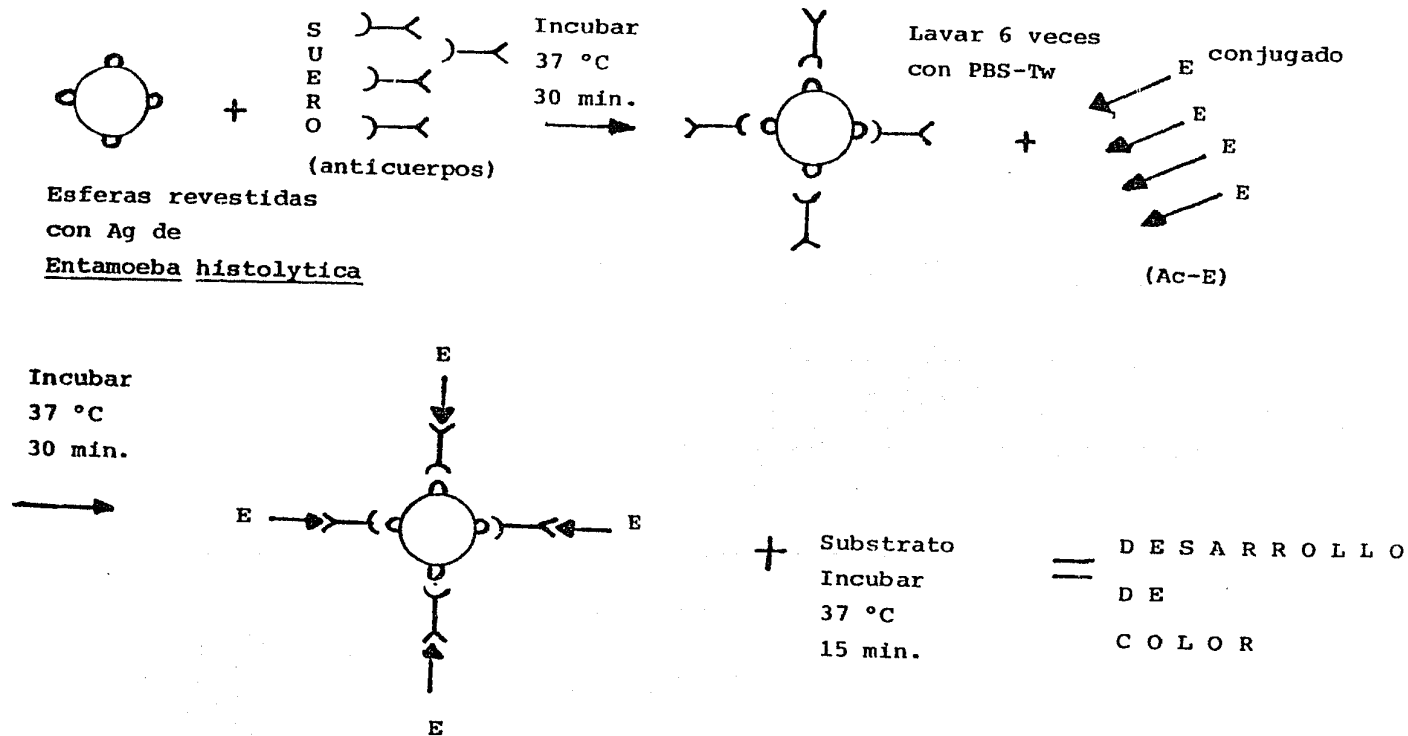


Fig. 4

METODOLOGIA PARA LA PRUEBA DE ELISA

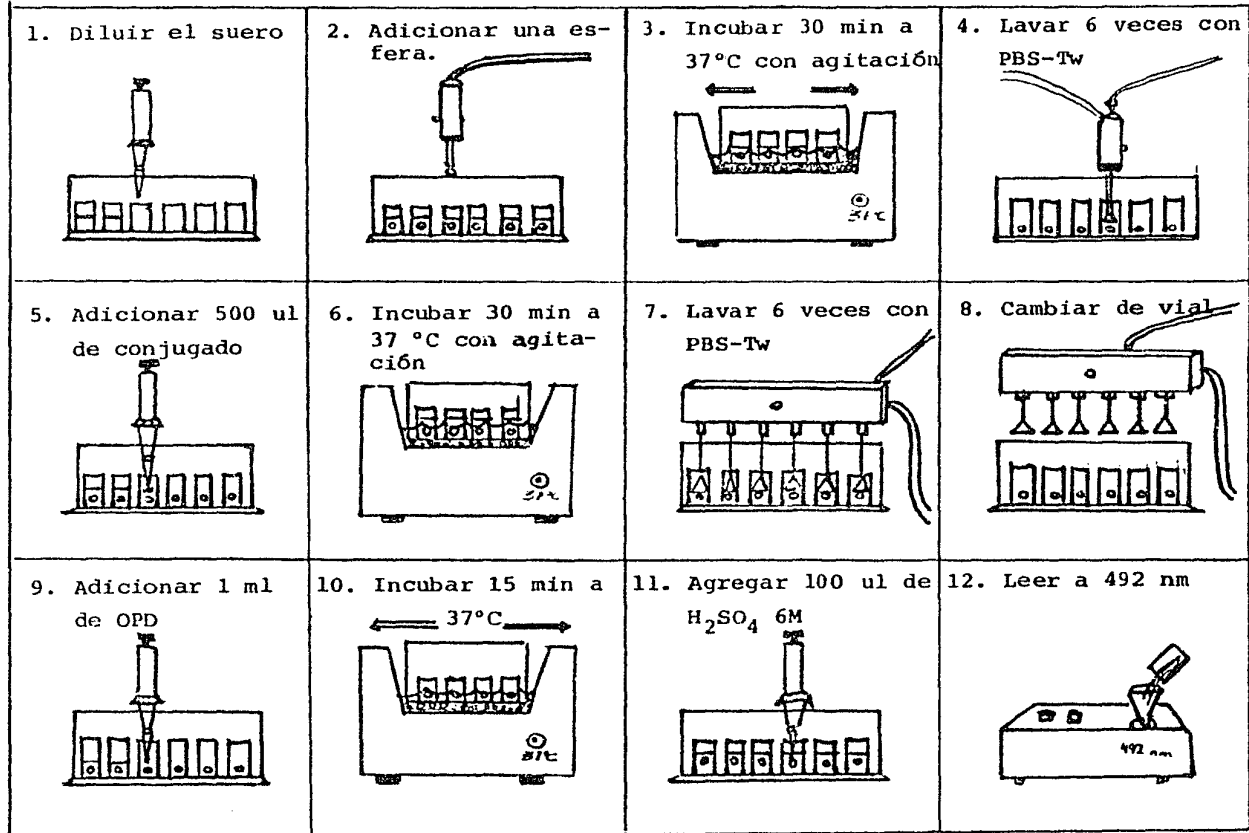


Fig. 5

DILUCION OPTIMA DEL SUERO

SUERO	D I L U C I O N				
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
+	+2	+2	+2	1.997	1.890
+	+2	+2	+2	1.978	1.720
-	0.700	0.605	0.477	0.382	0.199
-	0.654	0.482	0.391	0.284	0.170
-	0.573	0.490	0.399	0.357	0.121

Tabla 1

En esta tabla se observan las distintas dilu_ ciones de los sueros que se estudiaron, sien_ do 1:400 la dilución que nos logró diferenciar más entre los sueros positivos y negativos.

EVALUACION INTERENSAYO

DENSIDAD OPTICA					
DIAS	+	+	-	-	-
1	1.830	1.800	0.149	0.160	0.138
2	1.694	1.960	0.158	0.150	0.176
3	1.848	1.828	0.159	0.170	0.159
4	1.980	1.943	0.125	0.150	0.154
5	1.920	1.704	0.150	0.132	0.165

Tabla 2

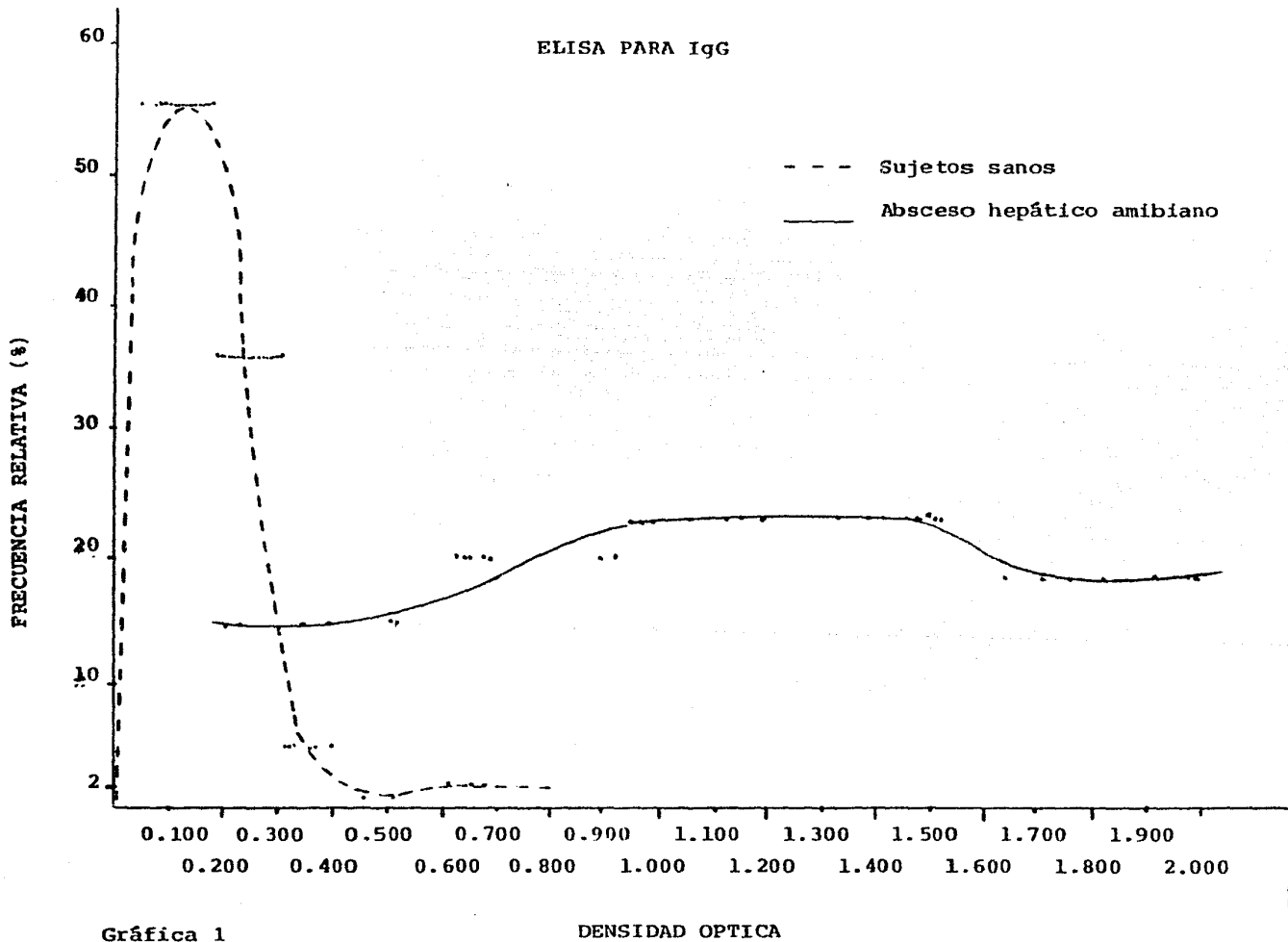
Para la evaluación interensayo, se estudiaron 5 sueros, dos positivos y tres negativos, aplicándose la ELISA a distintos días, posteriormente se calculó el Coeficiente de Variación para los positivos y para los negativos, siendo de 5.16 y 8.16 respectivamente.

EVALUACION INTRAENSAYO

DENSIDAD OPTICA					
M I S M O D I A	+	+	-	-	-
	1.972	1.923	0.136	0.145	0.137
	1.806	1.834	0.174	0.144	0.175
	1.935	1.985	0.157	0.120	0.155
	1.812	1.697	0.152	0.153	0.165
	1.716	1.849	0.163	0.154	0.155

Tabla 3

En la evaluación intraensayo, se estudiaron 5 sueros, dos positivos y tres negativos, a los cuales se les aplicó la ELISA, 5 veces el mismo día, posteriormente se calculó el Coeficiente de Varación para los positivos y negativos, siendo de 5.12 y 8.20 respectivamente.



Gráfica 1

DENSIDAD OPTICA

PRUEBA DE ELISA

VALOR DE CORTE	SENSIBILIDAD	ESPECIF.	V.P. (+)	V.P. (-)	EFICIENCIA
0.250	94.87%	83.75%	53.62%	98.80%	85.59%
0.300	94.87%	90.35%	66.07%	98.88%	91.10%
0.350	94.87%	95.43%	80.43%	98.94%	95.33%
0.400	92.30%	96.95%	85.71%	98.45%	96.18%
0.450	89.74%	97.46%	87.50%	97.95%	96.18%
0.500	89.74%	97.96%	89.74%	97.96%	96.61%

Tabla 4 En esta tabla se representan los distintos valores de corte, y los parámetros empleados para nuestro estudio, siendo 0.400 el seleccionado.

PRUEBA DE ELISA (IgG)

Valor de Corte 0.400	+	-	TOTALES
ABSCESO HEPATICO	36	3	39
SANOS	6	191	197
TOTALES	42	194	236

Tabla 5

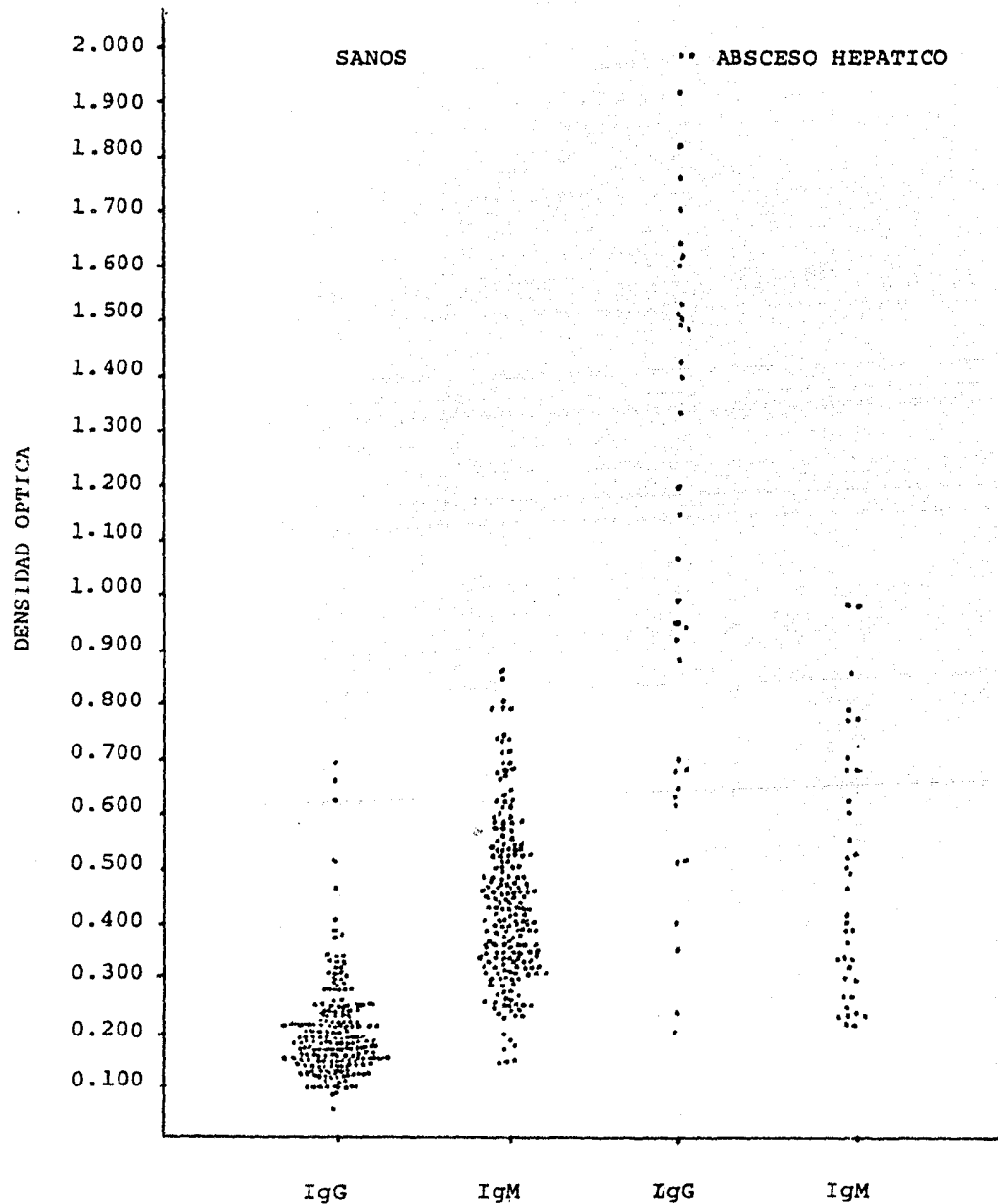
SENSIBILIDAD	92.30%
ESPECIFICIDAD	96.95%
V.P. (+)	85.71%
V.P. (-)	98.45%
EFICIENCIA	96.18%

PRUEBA DE CIE

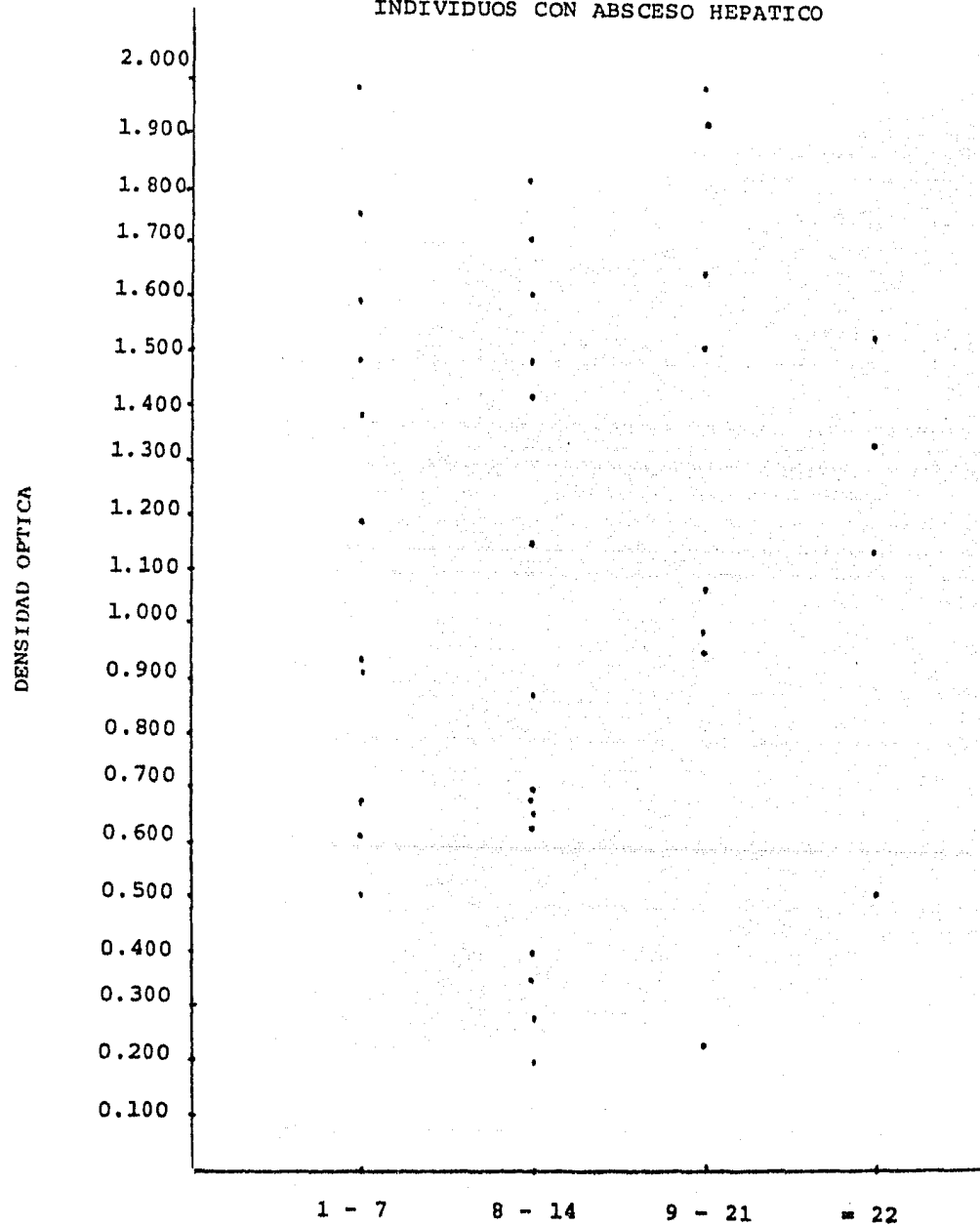
	+	-	TOTALES
ABSCESO HEPATICO	36	3	39
SANOS	1	196	197
TOTALES	37	199	247

Tabla 6

SENSIBILIDAD	92.30%
ESPECIFICIDAD	99.49%
V.P. (+)	97.29%
V.P. (-)	98.49%
EFICIENCIA	98.30%

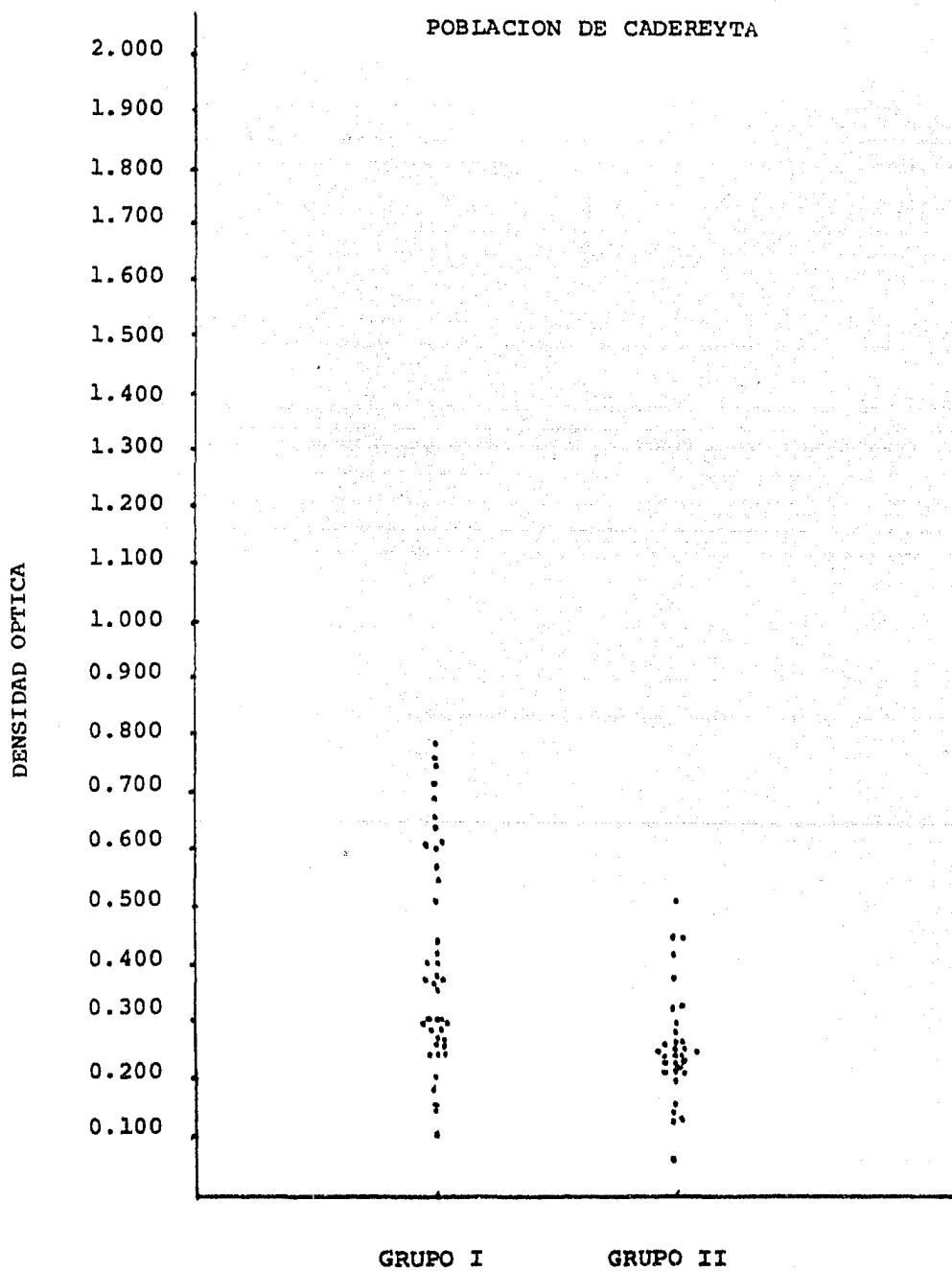


Gráfica 2



Gráfica 3

DIAS DE EVOLUCION PREVIOS
A LA TOMA DE MUESTRA



Gráfica 4

8. D I S C U S I O N

El antígeno preparado por el procedimiento descrito en materiales y métodos, fué lo suficientemente puro para ser empleado en la detección de anticuerpos contra Entamoeba histolytica.

Aunque el conjugado es estable aún por más de cuatro meses es necesario comprobar su actividad, mediante el empleo de esferas revestidas de IgG y placas de Immulon II en el caso de la IgM ya que el continuo congelamiento y descongelamiento de los conjugados bajan paulatinamente la actividad de los mismos.

La forma y número de veces de lavado de las esferas, es muy importante, ya que debe ser homogéneo y constante porque de lo contrario existe una gran variabilidad en los resultados.

El análisis de los resultados de la ELISA demostró que aunque existió una amplia distribución en los niveles de IgG específicos en los sujetos enfermos, sí fué posible diferenciarlos claramente de los observados en los sujetos sanos.

Por el contrario, los niveles de IgM fueron muy semejantes en ambos grupos, lo cual puede explicarse de la siguiente manera:

- Los niveles altos de IgG compiten con la IgM e interfieren en su detección.
- En conjugado anti IgM empleado, tiene reacción cruzada con la IgG.
- Existen reacciones inespecíficas con el medio de cultivo

axénico y por lo tanto se reflejan en los resultados.

Por todo lo mencionado anteriormente, sería de gran interés para trabajos posteriores, que a los sueros se les adsorbiera la IgG, y al quedar libre de esta inmunoglobulina, reaccione el conjugado específicamente con la IgM.

Debido a la alta endemicidad que existe en Cadereyta, era de esperarse que existiera una relación entre los individuos - portadores y no portadores de quistes, pero esto no fué posible y la interpretación que puede darse es que en el caso de los serológicos positivos, sufrieron de amibiasis invasiva y por lo tanto tienen niveles altos de anticuerpos y esto los protege - contra la Entamoeba histolytica, logrando que el parásito no se aloje en el intestino y por esta razón no se encuentren quistes en las muestras fecales.

Por todos los resultados obtenidos con las técnicas de CIE y ELISA, considero que la CIE debido a su elevada difusión, continúa siendo el método de elección para el diagnóstico serológico de absceso hepático amibiano, aunque debido al costo del antígeno es más conveniente usar el sistema ELISA, ya que por medio de la CIE la cantidad empleada de antígeno es mucho mayor. Asimismo el equipo utilizado para la ELISA no es muy costoso y además las reacciones coloridas son tan intensas que pueden ser evaluadas a simple vista en el caso de los sueros positivos, - sin necesidad de emplear un colorímetro, en cambio los sueros negativos tienen una reacción colorida muy débil. Es por esta

razón que puede distinguirse fácilmente cuando una prueba es -
positiva ó negativa.

Además, en la prueba de CIE para los sujetos enfermos, te-
nemos que las bandas de precipitación sólo son detectables -
cuando la ELISA tiene valores de densidad óptica de 0.500 en -
adelante.

9. C O N C L U S I O N E S

- La IgG específica evaluada por ELISA es de utilidad en el diagnóstico de absceso hepático amibiano.
- La técnica de CIE y de ELISA tienen la misma sensibilidad, semejante especificidad y eficiencia.
- Mediante la IgM específica contra Entamoeba histolytica no se logró diferenciar entre el absceso hepático antiguo y reciente.
- Los niveles de IgG aparentemente son independientes a los días de evolución del absceso hepático amibiano.
- No se encontró relación entre los portadores de quistes y la seropositividad.
- La fase sólida es estable a 4°C por tiempo prolongado.
- El conjugado mantiene su actividad hasta por cuatro meses en estado de congelación.
- La IgM no se pega a cualquier tipo de poliestireno.
- La disminución en la seropositividad de la CIE podría deberse al continuo congelamiento y descongelamiento de los sueros y a la contaminación de los mismos, teniendo como resultado la disminución en la cantidad de anticuerpos.

10. B I B L I O G R A F I A

- 1.- World Health Organization Expert Committee. WHO technical Report Series no. 421: 1-52 (1969)
- 2.- Elsdon-Dew, R. Adv. Parasitol. 6: 1-62 (1968)
- 3.- Kagan, I. G. Arch. Invest. Med. 5 (Suppl) 2: 457-464 (1974)
- 4.- Albach, R. A., Booden. T. In J. P. Kreier (ed). 2 Academic Press, New York, 455-506 (1978)
- 5.- Gutiérrez, G. Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N., Sepúlveda and L. S. Diamond. In B. Sepulveda and L. S. Diamond (ed). Instituto Mexicano del Seguro Social. 609-618 (1976)
- 6.- Elsdon-Dew, R, In B. Dawes (ed). 6 Academic Press. New York 1-151 (1968)
- 7.- Brandt, H., Pérez Tamayo, R. Prensa Médica Mexicana p 104 (1968)
- 8.- Alvarez-Alva, R., de la Loza-Saldivar, A., Arch. Invest. Med. 2 (Suppl) S 327 - S 332. (1971)
- 9.- Gutiérrez-Trujillo, G. Arch. Invest. Med. 9 (Suppl) S 281 - S 286 (1980)
- 10.- Bautista, J., Arch. Invest. Med. 9 (Suppl): S 411- S 415 (1978)
- 11.- Craig, C. F., Am. J. Trop. Med. 7, 225-240 (1927)
- 12.- Moan, J., C. Am. J. Trop. Med. Hyg. 6, 499-513 (1957)

- 13.- Halpern, B., Anderson, P. D. and Dolkort, R. E.
J. Lab. Clin. Med. 69, 467-471 (1962)
- 14.- Tupasi, T. E. and Healey, G. R. Am. J. Trop. Med. -
Hyg. 19, 43-48 (1970)
- 15.- Powel, S. J., Maddison, S. E. Wilmot, A. J. and Elsdon-Dew, R. Lancet ii, 602-603 (1965)
- 16.- Savanat and Chaicumpa, W Bull WHO. 40, 343-353 (1969)
- 17.- Morris, M., N. Powel, S. J. and Elsdon Dew, R. Lancet
ii, 1362-1363 (1970)
- 18.- Kessel, J. F. Lewis, W. P., Ma. S. and Kim, H. Procc.
Soc. Exp. Biol. Med. 106, 409-413 (1961)
- 19.- Goldman, M., Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 694-700 (1966)
- 20.- Engvall, E., and P. Perlmann. Protides Biol. Fluids
Proc. Coloq. 19, 553-556 (1971)
- 21.- Maddison, S. E., Kagan, I. G., Norman, L. J. Immunol.
(1970)
- 22.- Lee, E., Palacios, O. Kretschmer, R. Arch. Invest. -
Med. (Suppl): S 101 - S 106 (1970)
- 23.- Arellano, M. T., Ortíz-Ortíz, L. Arch. Invest. Med.
(Suppl) S 487 - S 490 (1979)
- 24.- Sepúlveda, B. and L. S. Diamond (ed) Instituto Mexicano
del Seguro Social, 668-685 (1976)
- 25.- Gutiérrez, G., Kumate, J. y Gutiérrez G., edit. México:
Méendez Cervantes 58-67 (1981)
- 26.- Diamond, L. S. J. Parasitol. 54: 1047-1056 (1968)