

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"



DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DEL METODO
ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS
ANTI-Entamoeba histolytica EN SUERO
HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ANA MARIA VERONICA TREJO ISLAS

A S E S O R

PABLO R. RIVERA HIDALGO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	ii

CAPITULO I

Introducción

0.1 Amibiasis y epidemiología.	3
0.2 Ubicación Taxonómica	4
0.3 Ciclo de vida.	4
0.4 Susceptibilidad.	5
0.5 Amibiasis intestinal y hepática.	6
0.6 Formas extraintestinales	6
0.7 Patogénica	7
0.8 Respuesta inmune contra <u>Entamoeba histolytica</u>	8
a) Inmunidad humoral	8
b) Coronamiento de anticuerpos.	10
c) Inmunidad Celular	11

CAPITULO II.

0.1 Métodos de Diagnóstico	13
a) En forma directa	13
b) En forma indirecta	13
0.2 Análisis inmunoenzimático.	15
0.3 Objetivos.	17

CAPITULO III

Material y Métodos

0.1 Obtención de muestras.	18
0.2 Purificación de Ac. IgG y anti IgG humana.	18
0.3 Inmunolectroforesis	19
0.4 Inmuno difusión radial simple.	

0.5	Preparación del antisuero.	20
0.6	Acoplamiento del Ac. a peroxidasa de rábano.	20
0.7	Titulación del conjugado	21
0.8	Crecimiento y cultivo de HMI - IMSS.	22
0.9	Preparación del Ag. de <u>Entamoeba histolytica</u>	23
	a) Ag. Total.	23
	b) Ag. Deslipidizado.	23
1.0	ELISA de tipo indirecto para detectar Ac. clase IgG anti amiba	24
1.1	Hemaglutinación indirecta.	24
1.2	Cuantificación de protefnas.	25
1.3	Materiales y reactivos	26

CAPITULO IV

Resultados	30
----------------------	----

CAPITULO V

Discusión	52
---------------------	----

CAPITULO IV

Conclusiones	55
------------------------	----

CAPITULO VII

Bibliografía	57
------------------------	----

Abreviaturas:

Análisis inmunoenzimático	ELISA
Amortiguador Fosfato - Salino	PBS
Amortiguador Fosfato-Salino-Tween 20 0.5%	PBS-TWEEN
Albumina sérica bovina	BSA
Hidroxí-metil-amino-metano	Tris
Densidad óptica	D.O
Grados Centígrados	°C
Microlitros	ul
Mililitros	ml
Litro	L
Microgramo	ug
Miligramo	mg
Gramo	g
Minutos	min
Hora	h
Molar	M
Normal	N
Suero Normal Humano	SNH
Suero Normal de Cabra	SNC
Solución Salina Fisiológica	SBF
Inmunoglobulina G.	IgG
Revoluciones por minuto	rpm
Antígeno	Ag
Anticuerpo	Ac
Absceso hepático amibiano	AHA
Radio inmuno análisis	RIA
Inmunofluorescencia Indirecta	IFA
Contrainmuno electroforesis	CIE
Hemaglutinación indirecta	IHA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

1.-	Inmunolectroforesis de IgG humana purificada.	30
2.-	Inmunolectroforesis de anti IgG humana purificada	31
3.-	Contrainmunolectroforesis de Ag. Total y Deslipidizado. . . .	32

LISTA DE GRAFICAS

GRAFICA

1.-	Curva estandar de proteínas Lowry.	34
2.-	Determinación de la concentración óptima de Ag. absorbido de <u>Entamoeba histolytica</u>	35
3.-	Determinación de la dilución óptima de sueros con Ag. deslipidizado.	37
4.-	Determinación de la dilución óptima de sueros con Ag. total. . .	38
5.-	Resultados ELISA sueros control y problema Ag. Total	40
6.-	Resultados ELISA sueros control y problema Ag. Deslipidizado . .	41
7.-	Comparación Ag. total y Ag. deslipidizado.	48
8.-	Comparación ELISA e IHA con Ag. Total.	50
9.-	Comparación de ELISA e IHA con Ag. deslipidizado	51

RESUMEN

La infección por Entamoeba histolytica es un problema de salud pública muy importante en todo el mundo. En México es una enfermedad endémica que ocupa el décimo lugar como causa de mortalidad en su población. (6)

En el presente trabajo se establece un método serodiagnóstico para detectar anticuerpos específicos anti-amiba, el cual se divide en dos partes, la primera que es el establecer las condiciones necesarias para el desarrollo de la técnica ELISA en la búsqueda de anticuerpos clase IgG anti Entamoeba Histolytica en suero humano, teniendo como método de referencia la --hemaglutinación indirecta.

En segundo lugar se evalúan las ventajas que proporciona al método el utilizar antígeno de E. Histolytica HMI-IMSS tratado de diferente manera -- como Ag. total y Ag. deslipidizado.

Ya establecidas las condiciones óptimas del ensayo inmunoenzimático se analizaron el mismo número de sueros (50) de pacientes sin diagnóstico de -- amebiasis y de pacientes con absceso hepático amebiano comprobado clínicamente (ultrasonido, IHA, radiografía).

Demostremos que ELISA como método serodiagnóstico es un excelente auxi-- liar en la detección de anticuerpos específicos en la amebiasis invasiva. -- Que es una prueba muy sensible, segura y adaptable a las diferentes necesidades de cualquier laboratorio.

Bajo nuestras condiciones de trabajo se consideró un suero positivo a amebiasis invasiva con una D.O. superior a 0.42 (dos desviaciones standar -- por debajo de la media). Los resultados muestran que la reproducibilidad -- del análisis inmunoenzimático se encuentra en el rango de aceptable como lo muestran los coeficientes de variación obtenidos en el inter e itra ensayo que para ambos tipos de Ag.

En relación a los dos tipos de Ag. utilizados en el análisis inmunoenzimático, se estableció una buena correlación entre ambos $r = 0.91$.

Los resultados obtenidos en la comparación de los dos tipos de antígenos no parece mostrar una diferencia significativa entre ellos. Por lo que se debería de llevar a cabo más estudios en relación al tipo de Ag. ambiguo para poder establecer cuál es el mejor tipo de antígeno a utilizar en un análisis inmunoenzimático.

Ambos métodos ELISA y hemaglutinación indirecta detectan anticuerpos contra *Entamoeba histolytica*, pero ELISA demostró ser varias veces más sensible que IHA en la detección de títulos de anticuerpos específicos.

CAPITULO I

INTRODUCCION

0.1 AMIBIASIS Y EPIDEMIOLOGIA

La amibiasis se define como la condición de hospedar Entamoeba histolytica con manifestaciones clínicas o sin ellas. (1)

Es la enfermedad parasitaria causada por Entamoeba histolytica ; aunque existen otras amibas que parasitan al hombre ésta es la única patógena para él, siendo capaz de producir lesiones en el intestino y ocasionar invasión a tejidos extraintestinales.

La forma más frecuente de la amibiasis es la intestinal, pero no se debe creer que la enfermedad se limita al aparato digestivo, puede haber implicaciones donde los parásitos migren de la pared del intestino a otras partes cercanas o lejanas del organismo dando lugar a graves complicaciones a nivel: pleural, hepático, cutáneo, y otros. (2,3)

Según datos estimados en 1981, aproximadamente 480 millones de personas fueron portadoras del parásito en todo el mundo WHO 1969) (4)

La amibiasis es una enfermedad endémica que existe prácticamente en todos los países del mundo, pero existen zonas geoeconómicas que difieren de la prevalencia de la infección e incidencia de la enfermedad tal es el caso de Asia, Africa y América Latina que son seriamente infectados por éste padecimiento. (5)

En México la amibiasis es un problema de salud pública muy importante y ocupa el 10° lugar como causa de fallecimientos dentro de la población.(6) Estudios seroepidemiológicos llevados a cabo en 1976 señalan que el 6% de la población estudiada presento anticuerpos, con lo que se demostró que toda la población independientemente de su edad o sexo puede ser infectada

y que los factores ambientales y socioeconómicos favorecen su propagación.
(7).

0.2 UBICACION TAXONOMICA

Entamoeba histolytica es un organismo clasificado dentro del reino animal, sub reino Protozoa, phylum Sarcomastigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rizopoda, clase Lobosea, subclase Ginnamoebia, orden Amoebida, suborden Tubulina, familia Entamoebidae, género Entamoeba. (8)

Forma parte de un conjunto de organismos denominados amibas, que agrupan especies heterogéneas filogenéticamente que comparten la característica de poseer una morfología altamente variable. La familia comprende a: Endolimax nana, Iodameba bustschlii, Dientamoeba fragilis, separadas de las amibas de vida libre Naegleria y Acantamoeba (8)

0.3 CICLO DE VIDA

Entamoeba histolytica presenta en su ciclo de vida cuatro etapas distinguibles morfológicamente: fase activa de trofozoíto, trofozoíto en fase prequistica, fase de quiste y trofozoíto en fase metaquistica. El hombre es el hospedero natural, se infecta mediante la ingestión de quistes viables que pasan a través del tracto digestivo y en la porción baja del intestino delgado por acción de jugos digestivos, se rompe la pared del quiste, liberando una amiba metaquistica de cuatro núcleos que finalmente se dividen en ocho trofozoítos pequeños uninucleados, dichos trofozoítos se fijan a la pared del intestino, maduran y pasan a la fase de trofozoíto activo, la fase principal de su ciclo de vida, en la que presenta gran acti-

vidad fagocítica y pinocítica así como alto grado de motilidad. Después de un tiempo determinado, algunos trofozoítos debido a estímulos no definidos disminuyen su actividad y dejan de emitir pseudópodos, el contenido vacuolar y elementos visibles en el citoplasma disminuyen y se redondean apareciendo una pared celular, ésta es la fase que se denomina quiste.

Los quistes se dispersan en las heces en grandes cantidades y para que el ciclo comience de nuevo necesitan ser ingeridos por un hospedero adecuado ya que su viabilidad es limitada. (8,9)

0.4 SUSCEPTIBILIDAD

No todos los individuos expuestos a la amiba desarrollan la enfermedad clínica; esto sugiere que algunos individuos puedan ser más resistentes en forma innata, o que existan cepas patógenas y cepas no patógenas. Sargeant y col en 1978 utilizaron las isoenzimas de los trofozoítos como marcadores genéticos para diferenciar las cepas invasivas de las no invasivas. (3,10,11)

Se ha sugerido reiteradamente que la dieta es uno de los factores que modifican la infección, ya que pueden favorecer cambios en la flora bacteriana ocasionando con esto aumentar la capacidad del parásito para producir lesiones. (12)

Se ha observado que la invasividad de la amiba puede acentuarse cuando se asocia a ciertas infecciones bacterianas siendo las más comunes : Echerichia coli enteropatógena Eberthella thyposus, Salmonella y otras. (3, 12,13) Otros factores que han demostrado influir sobre la predisposición a la infección están relacionados con el origen geográfico, estado inmune de el hospedero. (13,14)

En relación a la prevalencia de casos de abscesos hepáticos amibianos se ha observado que el sexo masculino es más susceptible que el femenino los factores responsables de la incidencia observada se desconocen, pero, pudieran deberse a factores hormonales. (13)

0.5 AMIBIASIS INTESTINAL Y HEPATICA

Los tres aspectos clínicos de la amibiasis son : Disentería amibiana aguda, Amibiasis crónica asintomática y amibiasis invasiva.

Prácticamente en todos los casos la infección primaria en la amibiasis se localiza en el intestino. En estudios realizados post-mortem se encontro que el ciego y colon ascendente son los segmentos intestinales afectados con mayor frecuencia; las razones de esta particular distribución se desconocen. (15)

Macroscópicamente la lesión inicial de la amibiasis intestinal tiene gran variación morfológica; al inicio se observan lesiones puntiformes de la mucosa con bordes hiperémicos, úlceras de diferentes tamaños, frecuentemente existen zonas de necrosis superficial de la mucosa.

Microscópicamente la lesión amibiana muestra abundante material necrótico mezclado con trofozoitos, la reacción inflamatoria no es muy acentuada, frecuentemente la úlcera se extiende debajo de la mucosa hacia la submucosa; la necrosis puede llegar a capas musculares y hasta el peritoneo. (14,15)

0.6 FORMAS EXTRAINTESTINALES

Perforación intestinal : la forma de pasar del parásito a la cavidad

peritoneal es rompiendola ocasionando peritonitis aguda.

Amibiasis cutánea: por extensión, ésta complicación generalmente se localiza en la región perianal y en los organos genitales.

Amibiasis hepática : de las formas extraintestinales el organo más afectado es el hígado, aceptandose la circulación portal como la más común para dicha diseminación. Es la complicación más frecuente y grave de la amibiasis intestinal. En el absceso hepático, el material necrótico esta constituido por el parénquima hepático destruido por el efecto histolytico de la amiba. En el hígado la licuefacción del material necrótico es mayor que en otros sitios por el gran tamaño que puede alcanzar el absceso; el tamaño del absceso varia desde puntiforme hasta una colección que ocupa el 90% de el organo. En las dos tercias partes de los casos el absceso es único y se localiza en el lóbulo derecho.

El cuadro clínico es inconstante y muestra grandes variaciones de síntomas y signos, pero en la mayoría de los casos se ha asociado a dolor en el costado derecho, hepatomegalia y fiebre. (3, 15,16,17)

0.7 PATOGENIA

Entamoeba histolytica produce citólisis por contacto sobre diversos tipos celulares (linfocitos, PMN, monocitos, macrófagos y células de línea CHO, Henle, 407, hepatocitos), pero los mecanismos efectores no se han dilucidado de manera completa.

Se han hecho investigaciones sobre la patogenicidad de Entamoeba histolytica en relación con su habilidad para producir enfermedad en el huésped se a dicho que las bacterias asociadas pueden exaltar el daño que ocasiona además de la variedad de enzimas proteolíticas que se han encontrado en el trofozoito.

La adhesión, la citólisis por contacto además de la fagocitosis y las enzimas se proponen como hipótesis para aclarar la patogénia de la amiba. [18]

0.8 RESPUESTA INMUNE CONTRA Entamoeba histolytica

Una de las principales contribuciones que ha influido significativamente para el avance en el estudio de la amibiasis, es la estandarización del cultivo axénico de Entamoeba histolytica por Diamond (19), que nos hace posible el tener un antígeno específico y puro, (20) que nos permite estudiar diversos aspectos de este protozoo así como la respuesta inmune del hospedero a la infección.

Entamoeba histolytica induce ambas respuestas inmunes, la humoral y la celular, en el humano que la hospeda durante la amibiasis invasiva, pero no se ha podido establecer cuales mecanismos son los responsables de limitar la invasión, ya que se ha observado que en pacientes con colitis amibiana pueden tener infecciones repetidas, mientras que pacientes que hayan tenido un absceso hepático amibiano es muy raro que se vuelva a presentarse. (3)

Las manifestaciones clínicas y el grado de severidad que alcance la amibiasis estarán determinados por el equilibrio entre los mecanismos de defensa del hospedero y los de agresión del parásito.

a) INMUNIDAD HUMORAL

Un estudio seroepidemiológico demostró que en los pacientes con amibiasis invasiva o absceso hepático amibiano, entre el 81-100% desarrollan anticuerpos circulantes específicos clasee IgG contra Entamoeba histolytica, detectables después de una semana de la aparición de los síntomas; un hecho de gran interés, es que los anticuerpos específicos anti-amiba persisten largo tiempo post-infección, se ha reportado que puede ser de 2 a 5 años (6,21)

Durante la infección los niveles de IgG especialmente la subclase IgG₂ se incrementan siendo la clase de inmunoglobulina que predomina en la respuesta inmune humoral. (22)

Se ha demostrado que las inmunoglobulinas anti-amiba ejercen un efecto citopático sobre los trofozoítos de Entamoeba histolytica in vitro (23,24)

Estudios sobre el tema mostraron que los niveles de otras inmunoglobulinas, si bien se observaron aumentadas, éste incremento es menos importante, tal es el caso de la IgA e IgM. Los niveles de IgA se encontraron incrementados en la amibiasis intestinal, mostrando así una respuesta inmune local de la mucosa intestinal mediante la detección de coproanticuerpos. (25,26,27,28)

El complemento es otro factor inmune involucrado en la defensa del hospedero contra Entamoeba histolytica. El suero de pacientes infectados con altos títulos de anticuerpos contra Entamoeba histolytica son buenos amebicidas, a través de la activación de la vía clásica y alterna del complemento . (29,30)

Sin embargo la experiencia clínica observada en el curso de la enfermedad demuestra que la respuesta inmune humoral que se dirige contra Entamoeba histolytica en la amibiasis invasiva no parece limitar el establecimiento de la infección o de proveer adecuada resistencia a la invasión. La respuesta de anticuerpos específicos que regularmente se observa en el suero tiene su mayor utilidad como marcador en el diagnóstico de la enfermedad invasiva, especialmente en el absceso hepático amibiano, (2,6,21,31)

b) CORONAMIENTO DE ANTICUERPOS

El movimiento que muestra Entamoeba histolytica y sus propiedades fagocíticas y pinocíticas revelan un recambio en los componentes de su membrana. Estos eventos morfológicos nos hacen pensar que este protozoo rido dispone de una actividad de membrana, que le permite deshacerse rápidamente de cualquier ligando o partícula unida a su superficie, ya sea por desprendimiento o fagocitosis. Esta propiedad podría ser un mecanismo de la amiba para evadir la acción efectora del sistema inmune.

Una rápida redistribución de ciertos componentes de la superficie de Entamoeba histolytica sigue a la interacción con una variedad de ligandos externos tales como : lectinas, anticuerpos específicos y otros. Los anticuerpos reaccionan con los antígenos de superficie de trofozoitos vivos e indujeron una redistribución de los componentes de superficie hacia un polo de la célula de manera análoga al coronamiento reportado para los linfocitos. El sitio de formación de los capuchones fué la región del uroide. En las cepas HMI HK9 de Entamoeba histolytica y en Entamoeba invadens se mostró que los capuchones se liberaron al medio como vesículas de 2-5µm de diámetro compuestas de anticuerpos y componentes de membrana de los trofozoitos; la liberación no disminuyó la viabilidad celular . (32)

La redistribución normal de receptores y antígenos en la superficie de la amiba es uniforme, pero sólo se lleva a cabo bajo condiciones óptimas de temperatura y concentración de ligandos. Es posible que ambas, la redistribución de los antígenos y la subsiguiente liberación del capuchon se encuentren regulados por componentes del citoesqueleto, principalmente por microfilamentos de actina, que se acumulan en la región del

uroide en amibas coronadas. (33)

Observaciones realizadas en los que se utiliza la cepa NHI 200 y concentraciones menores de anticuerpo, mostraron que los anticuerpos, que se unieron a la superficie en parte se liberaron al medio pero substancialmente se internalizaron en los trofozoítos y se degradaron, pero no se liberaron al medio como capuchones. (34)

Posiblemente la rápida desaparición del complejo antígeno-anticuerpo de la superficie del parásito puede volver a las amibas menos susceptibles a la respuesta inmune humoral.

C) INMUNIDAD CELULAR

La interacción directa entre las células inmunes y los trofozoítos es uno de los aspectos más importantes de la inmunidad celular en la amibiasis. Estudios iniciales in vitro mostraron que los trofozoítos ejercieron un efecto citotóxico directo a distancia sobre los leucocitos periféricos no sensibilizados que provocaron lisis y fagocitosis posterior. Usando preparaciones purificadas el resultado de la interacción con polimorfonucleares dependió de la relación amiba/PMN y la virulencia de la cepa de trofozoito utilizada. Los trofozoítos virulentos HMI destruyeron a los PMN por un mecanismo dependiente de contacto a relaciones mayores de 1000 PMN/ amiba sin pérdida de la viabilidad. Los PMN lograron destruir la amibas de virulencia intermedia también por mecanismos dependiente de contacto perdiendo la viabilidad y a los trofozoítos avirulentos sin pérdida de la viabilidad. (5)

Algunos estudios han demostrado que en pacientes con absceso hepático amibiano presentan una adecuada proliferación en las respuestas de

de intradermo reacción con antígeno amibiano, prueba de la migración de los macrófagos , acción agresiva de linfocitos sensibilizados sobre trofozoítos de Entamoeba histolytica. (2,14)

CAPITULO II

0.1 METODOS DE DIAGNOSTICO

a) EN FORMA DIRECTA

Por la identificación del organismo en las heces o en el material aspirado del absceso en el caso de la amibiasis hepática. El exámen de las muestras debe hacerse por personal capacitado que sea capaz de distinguir la amiba de entre otros protozoarios o helmintos, bacterias o levaduras así como diferenciar Entameba histolytica de otras amibas intestinales y macrófagos.

En el caso de la amibiasis intestinal, el diagnóstico definitivo lo proporciona la identificación de Entamoeba histolýtica en heces y en biopsias .

La enfermedad hepática puede ser diagnósticada clínicamente, ya cuando los abscesos se presentan, en el hígado ocurre un alargamiento asimétrico. El borde del lóbulo alargado usualmente es palpable y muestra dolor a la palpación. El lóbulo derecho es el más comunmente infectado. Los abscesos son frecuentemente demostrads por exploración con radiografías, ultrasonido y otros. (35)

b) EN FORMA INDIRECTA

Demostrando la presencia de antígeno o anticuerpos específicos en el suero y otros flúidos. Numerosos métodos serológicos se han desarrollado para el diagnóstico de la amibiasis particularmente en la amibiasis invasiva. El mejor tipo de prueba inmunológica ha sido la detección de anticuerpos específicos en suero.

En estudios realizados para evaluar la sensibilidad de diferentes pruebas serológicas como Hemaglutinación indirecta, inmunolectroforesis, contra inmunolectroforesis, inmunodifusión en gel de agar, aglutinación por partículas de látex, entre otras, se ha reportado que la IHA es capaz de detectar anticuerpos en el 95-100% de los casos de diagnóstico de absceso hepático amibiano y de 85-95% en el caso de la enfermedad invasiva intestinal. En relación a la identificación de portadores asintomáticos de quistes se ha encontrado una gran variación, dependiente de la prevalencia del parásito y de la enfermedad en su área geográfica. (5,6,7)

Aunque no se ha demostrado la existencia de anticuerpos protectores en individuos que han sido infectados por Entamoeba histolytica, la respuesta inmune en la amibiasis invasiva incluye una rápida aparición de anticuerpos circulantes específicos anti- amiba los cuales se pueden detectar por los diferentes métodos inmunológicos antes mencionados IHA, aglutinación en látex, inmunodifusión, inmunolectroforesis, contra inmunolectroforesis y más recientemente se ha reportada la estandarización del análisis inmunoenzimático E L I S A para la detección de anticuerpos específicos anti- amiba, empleando diferentes fases sólidas como son placas de microtitulación de poliestireno, discos de plástico, tubos de plástico, etc.. (36,37)

O.2 ANALISIS INMUNOENZIMATICO

En la década de los 70's se introdujo un importante avance en las técnicas para el diagnóstico que utilizan reactivos no isotópicos. A la fecha el método más ampliamente utilizado es ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) desarrollado independientemente en 1971 por Avrameas y Guilbert; Engvall y Perlman; Von Weemen y Schurs.

Es uno de los procedimientos de diagnóstico rápido y más empleado en enfermedades infecciosas y parasitarias, esto se debe principalmente a la versatilidad de la prueba, la cuál nos permite poner de manifiesto tanto anticuerpos como antígenos en líquidos biológicos. Este es una alternativa realista al radio inmunoanálisis o a la inmunofluorescencia ya que ha demostrado ser tan sensible y específico como éstos (36)

Algunas de las características que han hecho tan popular esta prueba son : su gran sensibilidad, su rapidez y el bajo costo en relación con otras metodologías disponibles, y la posibilidad de ser utilizada en estudios a gran escala, especialmente en su versión simplificada utilizando placas de microtitulación (Voller et.al. 1976). (36,37)

El análisis inmunoenzimático de tipo indirecto consiste fundamentalmente en poner en contacto la muestra problema que fundamentalmente contiene anticuerpos, con el antígeno unido a la fase sólida, después de incubar y lavar se adiciona el segundo anticuerpo conjugado con la enzima, se incuba y se lava posteriormente agregar el sustrato correspondiente , resultando la formación de un producto colorido cuya intensidad se mide en el espectrofotómetro a la longitud de onda adecuada. (38)

De los diferentes tipos de ELISA disponibles el más empleado es el

de tipo indirecto. En éste se utiliza la fase sólida recubierta con el antígeno sobre el cuál se desea poner de manifiesto anticuerpos específicos.

(36,37)

0.3 O B J E T I V O S

- 1.- Desarrollo y estandarización de un método inmunoenzimático ELISA, de tipo indirecto.
- 2.- Determinación de anticuerpos específicos de clase IgG anti Entamoeba histolytica en muestras de suero humano.
- 3.- Evaluar comparativamente dos fuentes de antígeno de Entamoeba histolytica : antígeno total y antígeno deslipidizado, por medio del análisis inmunoenzimático ELISA, tomando como método de referencia la hemaglutinación indirecta.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

O.1 OBTENCION DE MUESTRAS

Se analizaron 50 muestras de pacientes con diagnóstico de amibiasis invasiva comprobados por: radiografía, ultrasonid y serología, internados en el Hospital General Centro Medico "La Raza" y en la Unidad de Infectología del Hospital General de México, S.S.A. Y 50 pacientes ambulantes de la consulta externa del Hospital " La Raza " sin diagnóstico de amibiasis.

Las muestras se obtubieron mediante punción venosa, incubando a 37°C durante 30 min y centrifugando a 2000 rpm durante 10 min, para la eliminación del coágulo.

O.2 PURIFICACION DE ANTICUERPO IgG HUMANA Y ANTI IgG HUMANA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.(39)

Empleando dietil amino etil celulosa (DEAE-C) se aísla la IgG del suero. La resina es equilibrada a pH 7.5 en amortiguador fosfato salino (PBS), en la cuál todas las proteínas séricas excepto la IgG es ligada.

El suero es predializado contra el mismo amortiguador, se mezcla con la resina y el sobrenadante obtenido es esencialmente la IgG.

Se activa el DEAE-Celulosa en 1000 ml de HCl 0.5 N durante 15 min en agitación, se lava con agua destilada y se coloca la resina en un amortiguador fosfato salino hasta que el pH del sobrenadante sea idéntico con el amortiguador original.

Una vez activada la resina se pesan 17 g de DEA-E Celulosa Húmeda y se añaden goteando 2.5 ml del suero. Se mantiene la mezcla a 4°C durante

1 h y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante final contiene esencialmente IgG'

Se comprobó la pureza mediante inmunolectroforesis.

La metodología anterior se empleo para la purificación tanto de IgG humana como para la anti IgG humana desarrollada en cobra.

0.3 INMUNOELECTROFORESIS

Este método permite clasificar a las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética y actividad antigénica. Comprende dos fases sucesivas realizadas en agarosa: una electroforesis y una inmunodifusión. (40)

Se practicaron dos pozos en el agar (SIGMA) (agarosa 1% en amortiguador de barbital pH 8.6), depositandose en uno el suero purificado (IgG purificada) y en el otro pozo SNH. Se aplicó un campo eléctrico de 2 microamperes durante 90 min.

El campo eléctrico se interrumpe una vez que se ha separado las proteínas, entonces se introduce el antisuero polivalente (CAPPEL), en un canal cuyo eje es paralelo al de migración electroforética después de esto, se coloca en cámara húmeda durante 24 h, en las cuáles difunden los antígenos y el antisuero formándose bandas de precipitación.

0.4 INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

La finalidad de la inmunodifusión radial simple es la de identificar la reacción antígeno anticuerpo, por una precipitación en un medio semi-sólido donde el antisuero ha sido incorporado.

Se basa en la relación cuantitativa que existe entre la cantidad de antígeno depositado en un pozo horadado sobre la placa de agar-antisuero,

y el anillo resultante de precipitación. (41)

Por éste método se determinó la concentración de la inmunoglobulina G humana purificada. Se utilizó un equipo comercial Nor-Partigen (HOECHT-BEHRING)

0.5 PREPARACION DEL ANTISUERO

El anticuerpo contra IgG humana purificada se preparó en una cabra macho adulta inoculando subcutáneamente en 4 sitios diferentes 2.5 ml de suspensión volúmen/volúmen del anticuerpo [2mg/ml] y adyuvante completo de Freund, con sensibilizaciones durante un mes. Se dejó descansar durante 1 semana a la cabra, se sangra y se verifica la existencia de anticuerpos por inmunolectroforésis. Una vez comprobada la producción de anticuerpos anti IgG humana, se purificó la fracción IgG con resinas de intercambio. (DEAE-C)

El contenido de proteína del anticuerpo (anti IgG humana) fue cuantificado por el método de Lowry. (42)

0.6 ACOPLAMIENTO DE ANTICUERPOS A PEROXIDASA DE RABANO PICANTE

Una vez comprobada la pureza de la anti IgG humana por inmunolectroforésis, se procedió a su acoplamiento con peroxidasa de rábano tipo VI (SIGMA), según el método descrito por Avrameas y Terynck (43)

Se disolvieron 10 mg de peroxidasa de rábano tipo RZ3 VI en 20 ml de PBS 0.1M pH 6.8; se mezcló con 8 ml de glutaraldehído al 25% (para que resulte al final al 1%) e incubó por 18 h a temperatura ambiente. Se filtró la muestra en una columna de Sephadex G-25 larga Particle size 20-80 Pharmacia Chemicals) equilibrada con NaCl 0.15 M. Se colectó la peroxidasa en la zona de mayor coloración, y se agregó 5 mg de anticuerpo específico purifica

do (por resina de intercambio iónico) en un ml de NaCl 0.15 M. Se adicionó 0.2 ml de amortiguador carbonato/bicarbonato 1M pH 9.5 ; se incubó a 4°C por 24 h y se detuvo la reacción con 0,2 ml de Lisina 1M pH 7.0 (SIGMA), después de 2 h se dializó contra PBS frío.

Para conservar su estabilidad se mezcla cólumen a volúmen con glicerol y se almacena a -70; es estable durante un año.

0.7 TITULACION DEL CONJUGADO (44)

Consiste en la titulación de una serie de diluciones del antígeno conjugado, contra otra serie de diluciones del anticuerpo conjugado .

Las diluciones del antígeno purificado (IgG humana) se iniciaron con una concentración de 10 ug/ml y se realizaron diluciones dobles en amortiguador de carbonato 0.1M pH 9.6, efectuándose 8 diluciones [10ug/ml a 0,0781 ug/ml] de las cuáles se depositaron 200 ul por pozo de modo que cada hilera horizontal fué llenada con la misma dilución. Una vez recubierta la placa de microtitulación de poliestireno, se incubo durante 1h a 37°C y toda la noche a 4°C; se lavó 3 veces con PBS-tween.

Se realizaron diluciones dobles del anticuerpo (anti IgG humana) conjugada con peroxidasa de rábano, partiendo de una dilución de 1:500 hasta 1: 16000, con las cuáles se llenaron las hileras verticales , teniendo así en cada hilera una dilución diferente. El volúmen depositado por pozo fué de 200 ul incubando las placas durante 1 h a 37°C se repitieron 3 lavados con PBS-tween y a continuación se adicionaron a todos los pozos 200 ul de la solución de suirato (orto fenilen diamina SIGMA) en amortiguador de fosfatos citratos pH 5.0 mas 10 ul de peróxido de hidrógeno 30%), e incubando durante 30 min a 37°C después de los cuáles se interrumpió la reac-

-ción con 50 ul de H_2SO_4 2.5 N . Las lecturas fueron realizadas en un lector Technicon- MICRO ELISA a 492 nm'

El título o dilución de trabajo del conjugado enzimático es cuando la lectura fué mayor o igual a 1.0 de absorbancia.

El título encontrado para el conjugado enzimático preparado por nosotros fué de 1:2000

0.8 CRECIMIENTO Y CULTIVO DE HMI-IMSS

Los trofozoitos de Entamoeba histolytica cepa HMI-IMSS fueron criadas en tubos de vidrio y botellas de plástico. El medio empleado para el cultivo fue el TYI-S-33 de Diamond.

Composición del medio TYI-S-33

Para 100 ml de cultivo:

Biotriptasa	3.0	g
Dextrosa	1.0	g
Cloruro de Sodio	0.2	g
KH_2PO_4	0.264	g
K_2HPO_4	0.062	g
L- Cisteína.....	0.10	g
Acido ascórbico	0.020	g
Citrato férrico amonio	0.003	g

Se afora con agua destilada hasta 82 ml, se ajusta a un pH 6.8 y se esteriliza en autoclave 15 min a 15 lb. Se suplementa con 15 ml de suero bovino inactivado y 3 ml de vitaminas.

O.9 PREPARACION DE ANTIGENO DE Entamoeba histolytica

a) ANTIGENO TOTAL

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HMI-IMSS fueron obtenidos por crecimiento en cultivo axénico TYI-S-33 de Diamond en su fase logarítmica (72-96h) . Los trofozoítos cosechados fueron centrifugados a 1200 rpm durante 10 min y posteriormente lavados 6 veces con solución salina fisiológica. Las células fueron resuspendidas por aspiración-reaspiración con una pipeta Pasteur; se resuspendieron homogéneamente en un volumen definido y una gota de ésta suspensión se depositó en una cámara de Neubauer. Las células se contaron en los dos cuadrantes y el promedio de los trofozoítos contados por cuadrante se multiplicó por 10^4 . El sobrenadante se aspiró y se adicionó una solución de lisis (tritón X-100 0.5% V/V, N- etil maleimida 0.002M; tris-HCl 0.15M pH 8.0 NaCl 0.85M). Los trofozoítos lisados se dejaron en reposo durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm; se resuspende la pastilla en solución salina fisiológica.

b) ANTIGENO DESLIPIDIZADO

El antígeno total se deslipidizó mediante la adición de volumen a volumen de acetona; dejándose reposar en hielo durante 15 min; ésta operación se repite 3 veces más, en la última ya no se restituyó y la pastilla se dejó secar a 37°C; dicha pastilla se resuspendió en un volumen de SSF y el contenido de proteínas fué cuantificado por el método de Lowry para ambos tipos de antígenos.

Nota: El volumen de solución de lisis utilizada fué tal, que al final se tuviera una concentración de N-etil maleimida de 1mM por cada millon de trofozoítos utilizados.

1. ELISA DE TIPO INDIRECTO PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CLASE IgG ANTI-AMIBA

Una vez que el antígeno amibiano se adsorbió a la fase sólida, se lavó la placa 3 veces con amortiguador PBS-tween (3min cada lavado con agitación). A continuación se adiciona a la placa PBS-BSA-Tween para bloquear sitios libres (evitando así la adsorción inespecífica), adicionado 200 ul por pozo durante 1 h, se lavó nuevamente 3 veces la placa con PBS-Tween y se agregó 100 ul de la muestra problema y se incubó 1h a 37°C; se lava 3 veces con PBS-tween, a continuación se adicionaron 100 ul del conjugado enzimático (anti IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000, se incubó durante 30 min a 37°C; se repiten los lavados con PBS-tween y se añaden 100 ul del sustrato enzimático (orto fenilen diamino en amortiguador fosfatos-citrato pH 5 y 10 ul de H₂O₂ al 30%) incubandose durante 30 min a 37°C durante 30 min.

Finalmente se detuvo la reacción por la adición de 50 ul de H₂SO₄ 2.5N y se leyó en un Technicon-MICRO ELISA a una longitud de onda de 492 nm. El color es estable durante 2 h.

1.1 HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Esta prueba es un método sensible y reproducible para la detección de anticuerpos anti amiba. Los eritrocitos se sensibilizan con antígeno de Entamoeba histolytica de la parte soluble de la cepa HK9, y son aglutinados en presencia de anticuerpos específicos.

Se utilizó un equipo comercial para ésta determinación a los sueros de los pacientes problema. Cellognost- Amoebiasis (HOECHST-BEHRING).

1.2 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas fué importante en el transcurso del estudio, ya que en diferentes etapas del mismo fué necesario conocer la concentración del anticuerpo y/o antígeno. Para este propósito se empleo el método de Lowry.(42)

1.3 MATERIALES:

IgG PURIFICACION

DEAE-Celulosa (Diethyl-amino-ethyl-celulosa)

Papel Wattman

Hcl 0.5N

NaCl 0.5N

Buffer Fosfato Salino

CONJUGACION DE LA ENZIMA:

Peridoxidasa de rábano tipo VI Rz3
Buffer fosfato salino
Glutaraldehído al 25%
Sephadex
NaCl
Lisina 1 M
Glicerol

PREPARACION DE ANTIGENO:

Inhibidores de proteasas: Iodacetamida, N-etil maleimida
Buffer tris hidroxil amino metano
HCl
Triton X-100

DETERMINACION DE PROTEINAS

NaCO₃ al 2% 0.1 N
NaOH 0.1 N
CuSO₄ . 5 H₂O al 1%
KNaC₄H₄O₆ . 4 H₂O
CO₃OH
Reactivo de Folín-Ciocalteus
Agua destilada.

ELISA

Placas de Poliestireno
Amortiguador de recubrimiento pH 9.6
Buffer fosfato salino - Tween 20 0.5%
Buffer fosfato salino - Tween 20 - BSA 0.5%
Amortiguador del sustrato pH 5.0
Conjugado de peroxidasa de rábano picante
Orto - fenilen - diamina
Antígeno de la cepa HNL - IMSS, deslipidizado y total
Medio de cultivo axénico para la obtención de antígeno

IHA

Equipo comercial Cellognost - Amibiasis.

REACTIVOS:

METODO DE LOWRY:

Reactivo A: (solución Stock)

El reactivo A es una mezcla de tres soluciones Stock : A-1, A-2 y A-3.

A-1 :

Tartrato doble de Sodio y Potasio:

($\text{KNa}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$.) 2 H_2O ----- 2 g

H_2O destilada ----- 100 ml

A-2 :

Cu $\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ----- 1 g

H_2O destilada ----- 100 ml

A-3 :

Na_2CO_3 ----- 20 g

NaOH 0.1 N ----- 1000 ml

Para preparar un volúmen suficiente de reactivo para 25 determinaciones agregar en un matraz erlenmeyer de 125 ml. las siguientes cantidades de reactivos.

Reactivo A-1	_____	0.5 ml.
Reactivo A-2	_____	0.5 ml.
Reactivo A-3	_____	50.0 ml.

Reactivo B :

Reactivo de Fenol (Folin-Ciocalteu 1.0 N).

AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO pH 9.6

Na ₂ CO ₃	-----	1.5 g
NaHCO ₃	-----	2.93 g
Agua destilada	-----	1000 ml.

AMORTIGUADOR FOSFATO - SALINO (P. B. S.) pH7.4

NaCl	-----	8.0 g
KH ₂ PO ₄	-----	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	-----	1.149 g
KCl	-----	0.2 g
Agua destilada	-----	1000 ml.

P.B.S. - TWEEN 20

PBS pH 7.4	-----	1000 ml.
Tween 20	-----	5 ml.

P.B.S. - BSA

PBS pH 7.4	-----	1000 ml.
Albumina sérica bovina	-----	0.5 g

AMORTIGUADOR SUSTRATO pH 5.0

Acido cítrico	-----	1.92 g/ 100 ml
Na ₂ HPO ₄	-----	2.86 g/100 ml

A 6.075 ml. de ac. cítrico se le adiciona 6.42 ml de Na₂HPO₄ y
12.5 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 5.0

ORTO FENILEN DIAMINA:

40 ug de orto fenilen diamina se disuelven en 100 ml. de amortiguador
citrato - fosfato pH 5.0 más 40 ul de H₂O₂ al 30%

RESULTADOS

PURIFICACION DE IgG HUMANA

La inmunoglobulina G del suero humano se purificó predializando el suero contra el mismo amortiguador y mezclando con la resina activada (DEAE-Celulosa). El sobrenadante final que contiene esencialmente la IgG, se analizó por inmunoelectroforesis para probar su pureza.

El antisuero normal humano, al probarse con la IgG humana purificada por inmunoelectroforesis solamente reconoció una sola proteína manifestada por el arco de precipitación que se observa en la fig 1, en cambio con el suero normal humano SNH se observaron varias proteínas de acuerdo con el número de bandas de precipitación



Fig. No 1.- Inmunoelectroforesis de IgG humana purificada

- Donde:
- 1.- Suero Normal Humano
 - 2.- Antisuero polivalente (CAPPEL)
 - 3.- IgG humana purificada

PURIFICACION DE LA ANTI IgG HUMANA

Utilizando el método antes descrito para la purificación de IgG humana, se separó la fracción IgG del suero de la cabra, (el cuál contiene anticuerpos anti IgG humana), verificando su pureza mediante inmunolectroforésis.

La anti IgG humana reconoce una sola proteína en el suero normal humano demostrándose por una banda de precipitación.



Fig. 2.- Inmunolectroforesis de anti IgG humana purificada

- Donde: 1.- Suero normal humano
2.- Anti IgG humana desarrollada en cabra.
3.- IgG humana purificada

CONTRA INMUNOELECTROFORESIS DE ANTIGENO TOTAL Y DESLIPIDIZADO

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica tratados como antígeno total y deslipidizado se comprobó su reactividad con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano a los cuáles se les había comprobado el diagnóstico por IHA, ultrasonido y contraímuno electroforésis.

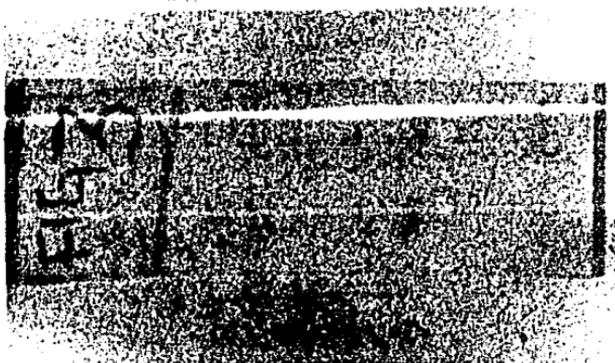


Fig. 3.- Contraímuno electroforésis de los antígenos total y deslipidizado con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano

- Donde: 1.- Suero de paciente con AHA
2.- Antígeno deslipidizado de E. histolytica
1'.-Suero de paciente con AHA
2'.-antígeno total de E. histolytica

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La concentración proteica del material antigénico de los trofozoítos de Entamoeba histolytica se determinó por el método de Lowry, obteniéndose una curva estandar, (gráfica N°1) la cuál se realizó a concentraciones que variaron de 25 ug a 100 ug/ml de albúmina humana, encontrándose una concentración de antígeno ambiano de 0.82 mg/ml para el antígeno deslipidizado y 1.62 mg/ml para antígeno total.

El coeficiente de correlación de la curva estándar para proteínas por este método, leído a una longitud de onda de 500 nm fue de: $r=0.9997$

TITULACION DEL CONJUGADO ANTI IgG- PEROXIDASA DE RABANO

La dilución del conjugado cuya lectura fue = a 1.0 en unidades de absorbancia fue de 1:2000 y esta dilución se utilizó en todos los experimentos de ELISA

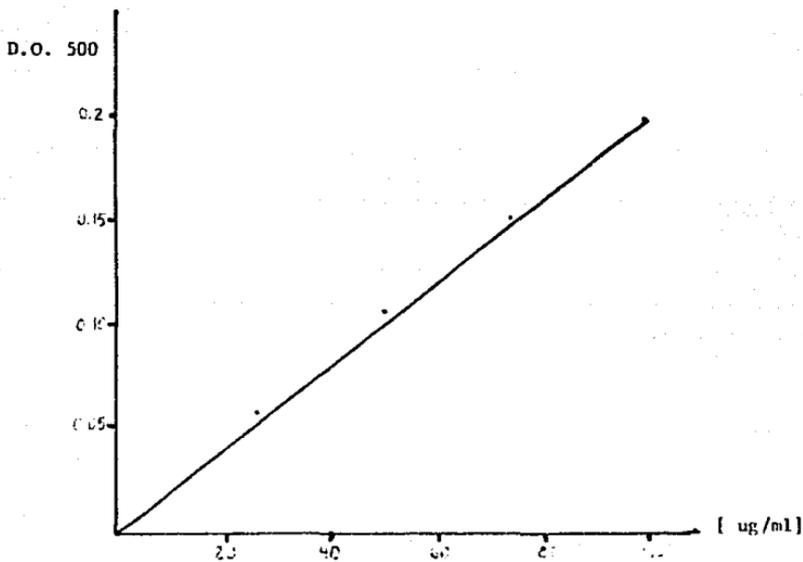
ESTANDARIZACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO

a) Determinacion de la concentración óptima de Antígeno

Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno total y deslipidizado de Entamoeba histolytica adsorbidos en las placas, que variaron desde 1,5,10,25 ug/ml, los cuáles se disolvieron en amortiguador de carbonato pH 9.6, adicionando a las placas 100 ul/ pozo; la dilución de trabajo tanto para los testigos positivos y negativos fue de 1:1024.

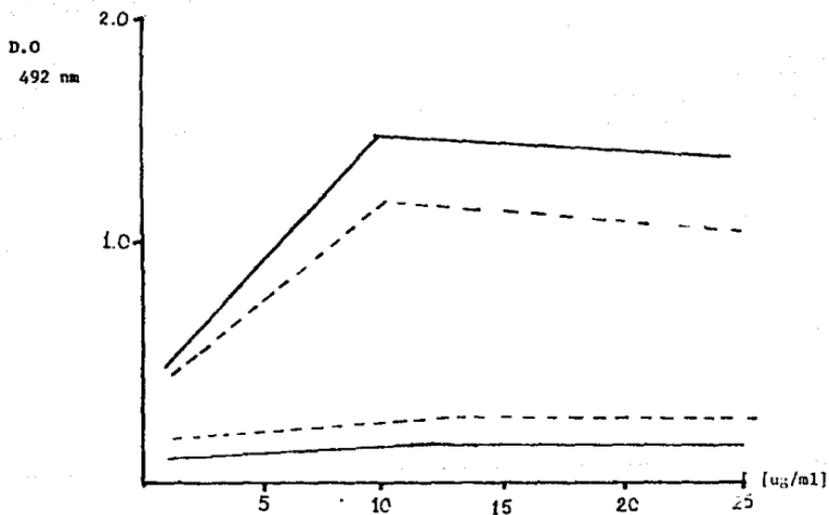
Los mejores resultados se encontraron en la concentración de 10 ug/ml para ambos tipos de antígenos (gráfica N° 2) en donde se aprecia que a con

CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION
DE PROTEINAS
LOWRY



GRAFICA 1

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE
ANTIGENO ADSORBIDO DE Entamoeba histolytica



GRAFICA 2

— Ag. Deslipidizado
- - - Ag. Total

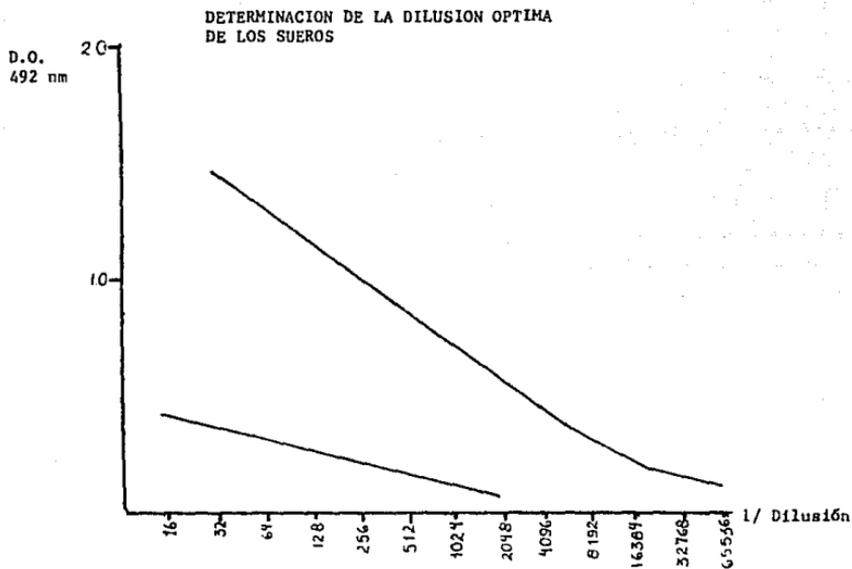
centraciones mayores de 10 ug/ml de antígeno, los valores de D.O no muestran aumento considerable y sí una pequeña disminución en las lecturas de D.O. Por ello la concentración de antígeno se conservó en 10 ug/ml para ser utilizada en la preparación de las placas para los experimentos posteriores.

b) Determinación de la dilución óptima de los sueros

Para determinar la dilución de trabajo tanto para sueros positivos como negativos, se mantuvo constante la concentración del antígeno adsorbido [10 ug/ml] y se realizaron diluciones dobles de los sueros a probar; en el caso de los sueros positivos partiendo de una dilución de 1:32 hasta 1:65000 1:65536 y para los sueros negativos iniciando de 1:16 hasta 1:2048.(gráfica N° 3,4), donde observamos el efecto de la dilución doble en los valores de D.O. tanto para sueros positivos como negativos. En base a los resultados mostrados y con el fin de simplificar el trabajo se seleccionó una sola dilución para probar los sueros de pacientes por el método de ELISA, que en nuestro caso fué de 1:1024.

ELISA EN EL SUERO DE SUJETOS CON DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS INVASORA Y PERSONAS NORMALES

Después de haber optimizado las condiciones del sistema ELISA tanto para antígeno total como para el deslipidizado se llevó a cabo la prueba en muestras de suero normales y con los de diagnóstico de amibiasis invasiva a una dilución de 1:1024 . Los resultados se muestran en la tabla y gráfica 5 y 6



GRAFICA 4

Ag. Total

De los 50 sueros probados de sujetos normales con antígeno total 38 (76%) muestran valores de D.O. entre 0.1 - 0.19 , 12 (24%) entre 0.2-0.29.

Con antígeno deslipidizado 14(28%) muestran valores de D.O = 0.1, 28 (56%) entre 0.1 y 0.19 y 8 (16%) entre 0.2 y 0.29.

TABLA I Valores de D.O. de las 50 muestras ensayadas de los pacientes con amibiasis comprobada clínicamente, los valores se distribuyen de la siguiente manera para ambos tipos de antígenos

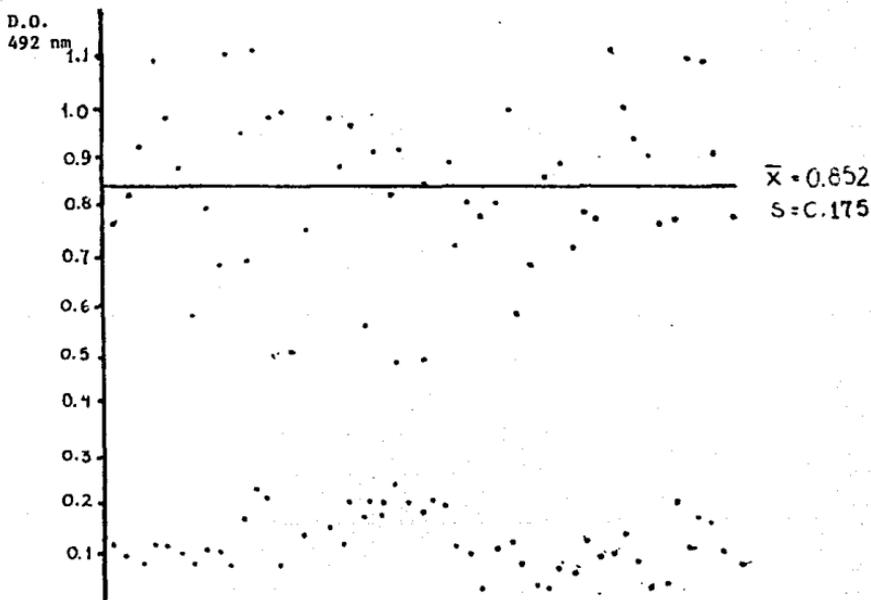
	Ag. Deslipidizado	%	Ag. Total	%
0.4 - 0.49	2	4	3	6
0.5 - 0.59	5	10	11	22
0.6 - 0.69	2	4	9	18
0.7 - 0.79	10	20	14	28
0.8 - 0.89	11	22	8	16
0.9 - 0.99	12	24	3	6
1.0 - 1.19	8	16	2	4

REPRODUCIBILIDAD

El ensayo inmunoenzimático ELISA se realizó bajo las condiciones descritas en métodos y su reproducibilidad intra ensayo con antígeno total se muestra en la tabla II y variación inter ensayo en la tabla III.

La reproducibilidad del ELISA con antígeno total muestra un coeficiente de variación aceptable.

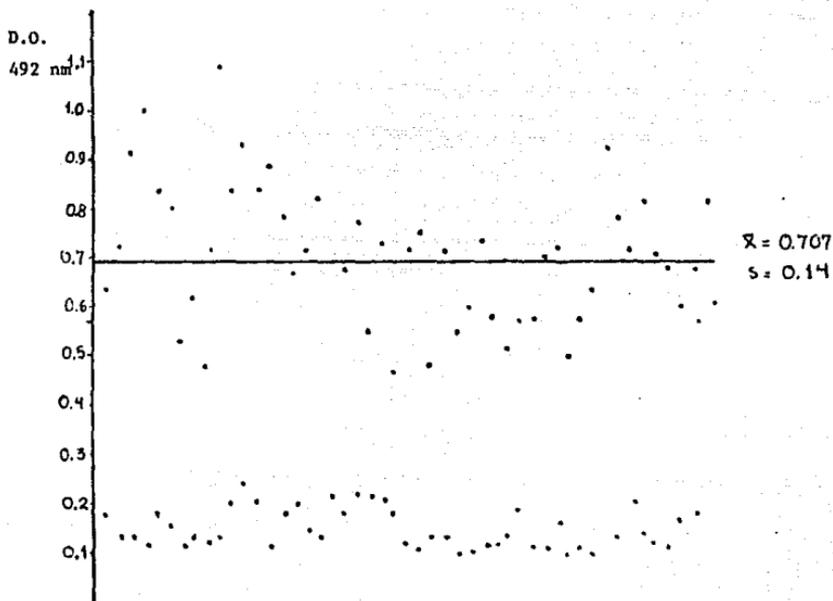
RESULTADO DE ELISA DE 50 SUJETOS CON AMIBIASIS
HEPATICA Y 50 SUJETOS CONTROL. A DIL 1:1024



GRAFICA. 5

Ag. Deslipidizado

RESULTADO DE 50 SUJETOS CON AMIBIASIS HEPATICA
Y 50 SUJETOS CONTROL A DIL. 1:1024
PRUEBA DE ELISA



GRAFICA 6

Ag. Total

TABLA II Reproducibilidad de los valores de D.O. de una muestra probada por triplicado a diferentes diluciones.
Intraensayo

Dilución	Valores por triplicado (D.O.)			Media
1:32	1.497	1.498	1.504	1.49
1:64	1.420	1.410	1.390	1.40
1:128	1.324	1.302	1.290	1.30
1:256	0.926	0.945	0.933	0.934
1:512	0.749	0.803	0.772	0.774
1:1024	0.695	0.684	0.657	0.678
1:2048	0.582	0.564	0.545	0.573
1:4096	0.475	0.427	0.452	0.451
1:8192	0.398	0.384	0.408	0.396
1:16384	0.200	0.193	0.206	0.199
1:32768	0.104	0.111	0.109	0.108
1:65536	0.092	0.099	0.095	0.095

El coeficiente de variación en la reproducibilidad con antígeno total fué de 2.68%

TABLA III Densidad óptica de una muestra probada a una dilución de 1024, en diferentes ensayos durante un mes.
Inter ensayo

Días Interensayo	valores por triplicado(D.O.)			Media
1	0.699	0.706	0.691	0.698
7	0.708	0.715	0.689	0.705
14	0.652	0.657	0.693	0.697
21	0.701	0.708	0.712	0.707
28	0.685	0.696	0.703	0.694

El coeficiente de variación inter ensayo con antígeno deslizado fué de 1.53%

La Reproducibilidad observada para el antígeno deslipidizado se observa en la tabla IV y su variación inter ensayo en la tabla V

TABLA IV Reproducibilidad de los valores de D.O. de una muestra probada por triplicado a diferentes diluciones
Intra ensayo

Dilusion	Valores por triplicado (D.O.)			Media
1:32	1.733	1.730	1.732	1.731
1:64	1.578	1.563	1.569	1.570
1:128	1.561	1.549	1.558	1.550
1:256	1.143	1.152	1.145	1.146
1:512	0.945	0.949	1.052	0.982
1:1024	0.801	0.849	0.867	0.839
1:2048	0.732	0.656	0.725	0.704
1:4096	0.486	0.410	0.456	0.437
1:8192	0.301	0.276	0.291	0.289
1:16384	0.211	0.188	0.197	0.198
1:32768	0.117	0.126	0.132	0.132
1:65536	0.097	0.081	0.087	0.088

El coeficiente de variación en la reproducibilidad con antígeno deslipidizado fué de 4.03%

TABLA V **Densidad óptica de una muestra ensayada a una dilución de**
1:1024, en diferentes ensayos durante un mes.
Inter ensayo

Días Interensayo	Valores por triplicado (D.O)			Media
1	0.801	0.822	0.790	0.804
7	0.839	0.825	0.901	0.855
14	0.867	0.903	0.892	0.887
21	0.829	0.837	0.827	0.831
28	0.852	0.842	0.849	0.847

El coeficiente de variación inter ensayo con antígeno
deslipidizado fué de 2.01%

ESPECIFICIDAD

Para demostrar que los anticuerpos detectados en nuestro análisis son específicos anti amiba, se realizó el siguiente experimento; tanto para el antígeno total como para el deslipidizado se prepararon diluciones dobles seriadas en SSF iniciado de una concentración de 100 ug/ml hasta 1.56ug/ml depositando 250 ul de cada una de éstas concentraciones de antígeno en tubos de 13x150 a los cuáles se les adicionó un volumen de 250 ul de un tes-tigo positivo a una dilución de 1:128 ; se incubó 37°C durante 30 min, transcurrido este tiempo se probó la reactividad del suero absorbido con el antígeno en el paso anterior (con un ELISA de tipo indirecto para de-tectar anticuerpos anti amibia), en el sobrenadante. Los resultados se expresan en las tablas VI yVII

Nuestros resultados demuestran que cuando existe exceso de antígeno las lecturas en absorbancia son menores, ya que todos los anticuerpos se encuentran bloqueados, en cambio cuando se tiene un exceso de anticuerpo las lecturas de absorbancia aumentan ya que estos pueden ser detectadas por el método de ELISA.

ESPECIFICIDAD

El análisis se realizó bajo las condiciones descritas en métodos para demostrar los anticuerpos específicos anti amiba por ELISA con antígeno total tabla VI y Ag. deslipidizado tabla VII

TABLA VI Especificidad del antígeno total

[ug/ml]	Dil. Suero	Valores por triplicado (D.O)			Media
100	1:128	0.136	0.158	0.150	0.148
50	1:128	0.335	0.348	0.351	0.344
25	1:128	0.358	0.360	0.363	0.360
12.5	1:128	0.684	0.627	0.656	0.655
6.2	1:128	0.694	0.649	0.669	0.670
3.1	1:128	0.788	0.771	0.696	0.751
1.5	1:128	0.865	0.941	0.881	0.895

TABLA VII Especificidad del antígeno deslipidizado

[ug/ml]	Dil. Suero	Valores por triplicado (D.O)			Media
100	1:128	0.135	0.122	0.124	0.127
50	1:128	0.348	0.324	0.321	0.331
25	1:128	0.623	0.589	0.639	0.617
12.5	1:128	0.870	0.748	0.729	0.782
6.2	1:128	1.165	1.002	0.999	1.050
3.1	1:128	1.304	1.105	1.100	1.169
1.5	1:128	1.355	1.206	1.205	1.250

Los resultados presentan un coeficientes de variación de 4.09% para el antígeno total y 6.95% para antígeno deslipidizado.

COMPARACION DE Ag. TOTAL Y Ag. DESLIPIDIZADO

En el transcurso de nuestro estudio se trabajó paralelamente antígeno total y antígeno deslipidizado de Entamoeba histolytica, con el objeto de establecer cuál de ellos proporciona al método mejores resultados, así como también para establecer si existe entre ellos una correlación y si sus resultados son significativos estadísticamente. Para nuestros resultados de ELISA para Ag. total y Ag. deslipidizados los tratamos de expresar de una forma en que se relacionaran las dos variables, ésto lo logramos expresar con el coeficiente de correlación simple: r

$$r = \frac{(\sum XY) - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}}{\sqrt{[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}][\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}]}}$$

El coeficiente de correlación simple se llevó a cabo en una calculadora Texas Instrument 57.

Los resultados mostraron los 2 tipos de antígeno fué un coeficiente de correlación de $r = 0.91$, que es aceptable, con lo que demostramos que sí existe correlación entre las dos variables.

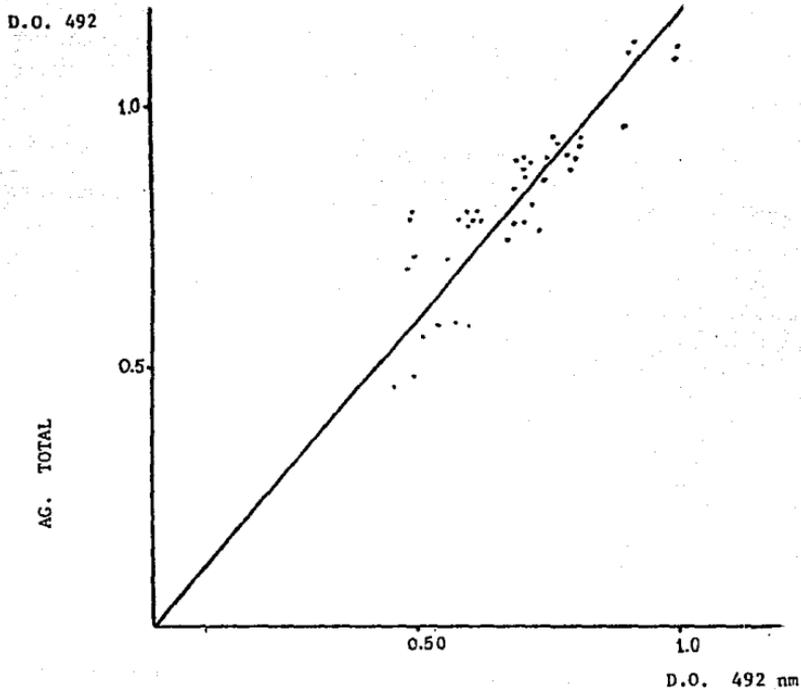
Una prueba es significativa estadísticamente, si el error de r multiplicado por dos, es menor que el valor de r, por lo tanto $p < 0.05$

$$r = 0.91$$
$$\text{error de } r = \frac{1}{n-1} ; \frac{1}{50-1} = 0.142$$

$$\text{error de } r (0.142 \times 2) = 0.2857$$

Como $0.285 < 0.91$ los resultados son significativos estadísticamente.

COMPARACION DE Ag. TOTAL Y Ag. DESLIPIDIZADO



GRAFICA 7
Ag. DESLIPIDIZADO

COMPARACION DE ELISA E IHA

Quando la prueba de ELISA y la de hemaglutinación indirecta se llevaron a cabo en las muestras de los pacientes, no se observó una buena correlación como lo demuestran las gráficas 7 y 8, y la comparación de los valores de absorbancia y títulos de IHA (Tabla VIII)

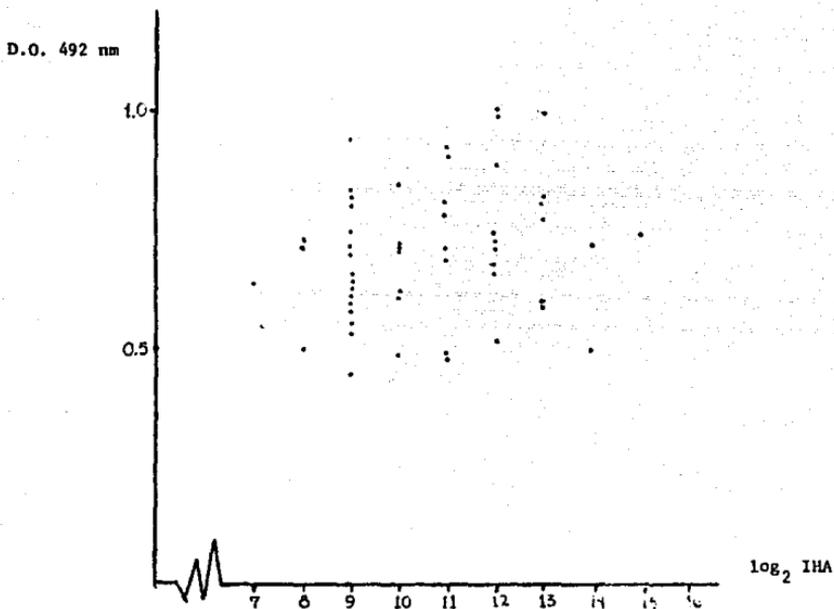
TABLA VIII Comparación de valores de absorbancia de ELISA y títulos de IHA en 50 pacientes con amibiasis invasiva. Antígeno deslipidizado'

ELISA D.O.	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536
0.4 - 0.49			1		1				
0.5 - 0.59			2			1	1		
0.6 - 0.69			1	1		1			
0.7 - 0.79	1	1	4			2	1		1
0.8 - 0.89		1	5	1	2	1		1	
0.9 - 0.99		1	3		2	2	3		
1.0 - 1.19			1	3	2	8	1	1	

TABLA IX Comparación de los valores de D.O de ELISA y títulos de IHA en 50 sueros de pacientes con amibiasis invasiva. Ag. Total

ELISA D.O.	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536
0.4 - 0.49			1	1	1				
0.5 - 0.59		1	6			1	2	1	
0.6 - 0.69	1		2	2	1	2			
0.7 - 0.79		2	3	1	3	2		1	1
0.8 - 0.89			4	1	1	2	2		
0.9 - 0.99			1		2				
1.0 - 1.19						1	1		

COMPARACION DE ELISA E IHA



GRAFICA 8

Ag. TOTAL

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Durante el establecimiento de las condiciones óptimas de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos específicos anti Entamoeba histolytica el problema más importante al que nos enfrentamos lo represento las reacciones inespecíficas comunmente denominadas de fondo o ruido Este problema es más frecuente con el uso de los sueros que con el con jugado, y esto se debe a que el suero representa una población heterogénea de anticuerpos y macromoléculas. Nosotros con el fin de disminuir al máximo este problema trabajamos todas nuestras muestras a una dilución de 1:1024 a la cuál la reacción de fondo fué mínima mientras que los valores de absorbancia para sueros positivos fue alta.

Después de haber optimizado las condiciones del sistema ELISA tanto para antígeno total y deslipidizado de Entamoeba histolytica, se llevó a cabo en la población en estudio.

Se ha demostrado que en el suero de pacientes con amibiasis invasiva la presencia de anticuerpos específicos anti-amiba durante el curso de la enfermedad (2,4,10,22). La prueba fué positiva en detectar anticuerpos específicos anti Entamoeba histolytica en todos los casos de amibiasis hepática estudiados. Mostrando valores de absorbancia promedio de 0.85 y 0.70 para antígeno deslipidizado y total respectivamente.

De los 50 sueros control analizados 28% (14) presentaron valores de absorbancia menores de 0.1 y 56% (28) entre 0.1 - 0.19 , el 16% (8) entre 0.2 - 0.29, con una absorbancia promedio de 0.135 para antígeno deslipidizado.

Con antígeno total el 76% (38) mostraron valores de absorbancia de 0.1 - 0.19 y 24% (12) entre 0.2 - 0.29 con un promedio de 0.158.

Se ha mencionado que la sensibilidad de ELISA en la detección de anticuerpos específicos anti Entamoeba histolytica es semejante al RIA (36)

Cuando los resultados de ELISA fueron comparados con los obtenidos con hemaglutinación indirecta se observó que todos los sueros que fueron positivos por IHA lo fueron también por ELISA, pero la sensibilidad que mostró esta última durante la estandarización fué mayor.

Los títulos de anticuerpos específicos detectados por ELISA fueron más altos que los detectados por hemaglutinación indirecta.

La técnica de ELISA y la de IHA no mostraron una buena correlación la variación que existe entre los resultados de ambas pruebas puede atribuirse a la cepa amibiana utilizada en la preparación del antígeno, así como de los reactivos para llevarla a cabo,

También es posible que ELISA e IHA detecten diferentes tipos de anticuerpos. Otros trabajos mencionan (37,38,45) que los anticuerpos detectados por hemaglutinación indirecta y pruebas de látex pueden ser diferentes de los detectados por ELISA e IFA y pruebas de difusión en gel,

Nosotros consideramos que se debe llevar a cabo más estudios en lo relativo a la preparación del antígeno amibiano con el que se adsorben las placas, en el ELISA que desarrollamos utilizamos como antígeno la cepa HM1 IMSS y en el equipo Comercia Cellognost Amoebiasis utilizan como antígeno la fracción soluble de la cepa HK9, estas diferencias en el origen del antígeno pueden influir sobre los resultados.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Los métodos inmunológicos y en particular los inmunoenzimáticos pueden ser excelentes auxiliares en el diagnóstico de diferentes padecimientos infecciosos y parasitarios ya que por la sencillez y versatilidad del análisis pueden adaptarse a las necesidades de cualquier laboratorio clínico.

En el presente trabajo se establecieron las condiciones necesarias de un sistema de análisis inmunoenzimático ELISA de tipo indirecto adaptado a placas de microtitulación de poliestireno con el que se pretende llevar a cabo en forma sencilla, sensible y reproducible el serodiagnóstico de anticuerpos específicos anti Entamoeba histolytica en el caso particular de la amibiasis invasiva.

Se comparó y evaluó las ventajas que proporciona al método el utilizar la misma cepa amibiana HMI IMSS tratada de diferente manera, como Antígeno total y antígeno deslipidizado.

En base a nuestros resultados podemos concluir que el análisis inmunoenzimático ELISA para detectar anticuerpos específicos con ambos antígenos proporcionó buenos resultados.

Se demostró que ELISA es más sensible que IHA en la detección de anticuerpos específicos ya que mostró detectar títulos de anticuerpos mayores que hemaglutinación indirecta. Además de su utilidad para adaptarse a estudios seroepidemiológicos a gran escala.

Se deben de llevar a cabo nuevas investigaciones relacionadas con el tipo de antígeno amibiano que se utilice para adsorber las placas. En nuestro trabajo los resultados obtenidos con ambos antígenos fueron satisfactorios, pero la bibliografía menciona (37,38,45) que el utilizar como antígeno la fracción soluble de la amiba, o una proteína específica purificada proporciona mayor sensibilidad al método.

Las pruebas serodiagnósticas en ocasiones como en la amibiasis invasiva son la única manera de diferenciar, mediante la detección de anticuerpos específicos un absceso hepático amibiano de uno piógeno o de un tumor. Esta rápida diferenciación serológica puede ser definitiva para el inicio del tratamiento.

CAPITULO VII

- 1.- World Health Organization Expert. Committe (1969) Amoebiasis. W.H.O. Thech Rep. Ser. 421-7.
- 2.- Salata, Robert A. and Ravdin, I. Jonathan. (1986). Review of the human Inmune Mechanisme Directed Against Entamoeba histolytica. Rev. Infect. Dis. 8:261-72
- 3.- Tamayo, Perez Ruy., Brand Herman. Amibiasis 1o. Ed. Edit. La Prensa Médica Mexicana. Méx., 1970.
- 4.- Trissl D. (1982). Immunology of Entamoeba histolytica in humand and animal host. Rev. Infect. Dis. 4:1154-84.
- 5.- Guerrant L. Richard. (1986) The global Problem of Amebiasis: Curren, Status Research, needs and opportunities for progress. Rev. Infect. Dis. 8: 218-227.
- 6.- Walsh J. (1986) Problems in recognition and Diagnosis of Amebiasis; stimation of the global magnitudes of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8:239.
- 7.- Gutierrez G., Ludlow A., Espinoza G. Herrera S., Muñoz O., Rattoni N., Sepúlveda B. (1976) Investigación de anticuerpos contra E. histolytica en la República Mexicana. Conferencia Internacional sobre Amibiasis IMSS.
- 8.- Levine N., Corlisa J., Cox F., Deroux F., Grain J., Jonigber B., Leedale F., Loeblich A., Loowj L., Merinfeld E., Page F., Poljansky F., Sprague V., Cavra J., Wallace Z. (1980) A Newly Revised Classification of the Protozoa. J. Protozool 27:37
- 9.- Barker D., Suales L. (1972) Characteristics of ribosomes during - differentiation from trofozoite to cyst in axenic Entamoeba sp Cell differ 1: 290-306.
- 10.- Kagan G., Irving. (1973). The Immunology of Amebiasis. Arch Invest. Med. (Méx) (supl. 1):395.
- 11.- Diamond.S.L. (1982). Amoebiasis: Nutritional Implications. Rev. Infect. Dis. 4:
- 12.- Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Bhasnani, R., Kimate. J. and Jimenez E. (1982) A Rewiev of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and no patrhogenic stocks isolated in Méx. Arch Invest. Med. (Méx.); 13 (supl. 3): 89.
- 13.- Gonzales M. F., Lee R. A., Aguirre G.J., (1971) Influencia del sexo y la edad en la amibiasis. Arch Invest. Med. (Méx.) 2 (supl. 1) :395.

- 14.- Ravdin. J., Guerrant R., (1984) A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of the amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4: 1185-207.
- 15.- Rebolledo Lara M. Gastroenterología, 1o. Ed. Editado por Mández - Oteo. Méx., 1965 p.pp 326-378.
- 16.- Beenson Mc Dermott: Tratado de Medicina Interna 14o. Ed. Edit. - Interamericana Méx. 1977 p.p. 581-586.
- 17.- Brown H.W., Delding D.L. Parasitología Clínica 6o. Ed. Edit. Interamericana Méx. 1981 p.p. 20-35.
- 18.- Kagan G. Irving. (1974) Pathogenicity of Entamoeba histolytica Arch Invest. Med. (Méx): 5 (Supl. 2); 457.
- 19.- Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C., (1978) A New medium for the cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1978);72.
- 20.- Thompson. S., Graedel C., Selmeider W., Stuky and Gordon R. (1968) Preparation and evaluation of standarized amoeba antigen from axenical cultures of Entamoeba histolytica. Bull W.H.O. 39:349
21. Knobloch J., Mannweiler E., (1983) Development an persistence of antibodies to Entamoeba histolytica in patientes with amebic liver abscess. Analysis of 216 casos. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:727.
- 22.- Maddisson S., Kagan G.I., Norman L. (1981) Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. J. Immunol 100;27
- 23.- Sepúlveda B., Tanimoto W. (1974) Neutralización de la virulencia - de cultivos de Entamoeba histolytica con suero inmune. Arch. Invest. Med. (Méx.)5 (supl.2) 447
- 24.- Sepúlveda B., Chevez A., Iturbe A., Ortiz L. (1973) Efecto de gama globulina inmune anti amiba sobre trofozoítos de Entamoeba histolytica. Arch Invest. Med. (Méx.)4 :79-86
- 25.- Abrove A., Lewis E., Mc. Farlanelt. (1972) clinical evaluation of serum immunoglobulins in amoebiasis. Immunology 23:937
- 26.- Dasgupta A. (1974) Immunoglobulina in healt an disease III: Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. Clin. Exp. Immunol. 16:163
- 27.- Martinez C.S., Gorab A., Muñoz O., Reves M. (1979) Coproantibodies in intestinal amebiasis. Arch Invest. Med (Méx.) 10:121
- 28.- Perches A., Kretscmer R., Sepúlveda B. (1970) Determinación de inmunoglobulinas en pacientes con amebiasis invasiva. Arch Invest. Med. (Méx.)1 (supl. 1) 97

- 29.- Sepúlveda B., Tanimoto W., Calderon J.; (1974) Inducción de inmunidad pasiva anti-amiba en hamster por inyección de suero inmune. - Arch Invest. Med. (Méx.) (supl. 2)451
- 30.- Healy G.r., Visuoasuara G.R., Kagan G.I. (1974) Observation in the persistense of antibodies to Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.)5 (supl. 2);495
- 31.- Muñoz M.L., Acosta V.H., Calderon J., (1978) Redistribución de anti genos superficiales de Entamoebas y su caracterización immunoquímica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (supl. 1): 183
- 32.- Martínez Paloma Adolfo The biology of Entamoeba histolytica Research Studies Press. 1982
- 33.- Chevez A., Iturbe - Alessio I., Segura M., Coroda D. (1972) Relaciones biológicas entre Entamoeba histolytica y otras células. I Complejo de asociación amiba-leucocito. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3 - (supl. 2):241
- 34.- Aust - Kettis A., Thortstensson R., Sundqvist K.G. (1981) Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and immune response III. Fate of the after binding to cell su face, Scand, J. Immunol 13:473
- 35.- Praxis medica. Tomo VI. Enfermedades Infecciosas y parasitarias - (UNAM) p.p. 6560 - 6569
- 36.- Voller A., Bartlett A., Bidwell D.E. (1978) Enzyme Immunoasays - wuth especial reference to ELISA techniques. J. Clin. Pathol. - 31:507-520
- 37.- T.M. Lin., S.P. Halbert., Chiu C.T., R. Zaerco. (1981) Simple Standardized ELISA for human antibodies to Entamoeba histolytica J. of Clin. Microb. 13:4 646-651
- 38.- Bos H. J., Von Den Eijk A. (1976) Enzyme Linked Immunosorbent assay ELISA in the serodiagnosis of amebiasis. International Conference Amebiasis. Méx., City.
- 39.- Peterson E.A., Sorbenr H.A. (1960) A rapid method of preparing pure serum gamma globulin. J. American Chem Soc. 28:271
- 40.- Fundenberg Hufg H., Cadwell L.J., Inmunologia Clínica 3a. Ed. Edit. El Manual Moderno. Méx. 1982.
- 41.- Scopes Robert. Protein purification principles and practice. 3a. Ed. Edit. Springer-Verlag. New York 1985.

- 42.- Lowry. O.H., Roserbrough. A.L., Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the follin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275
- 43.- Avrameas S., Ternyck T. (1971) Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enbaced intracelular penetration. Immunochemistry. 8:1175
- 44.- Parkhouse., Abney Ceska. (1972) Tecnología de hidrodroma aplicada al diagnóstico serológico de la oncoércosis. Immunochemistry 9: 1121